

T.C.
GENELKURMAY BAŐKANLIĐI
GÜLHANE ASKERİ TIP AKADEMİSİ
ASKERİ TIP FAKÜLTESİ
BİYOKİMYA VE KLİNİK BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
BAŐKANLIĐI

YAŞLANMAYA BAĞLI PARAOKSONAZ ENZİM
AKTİVİTESİNDEKİ DEĞİŞİMLER

Ercan SARUHAN
Dz.Tbp.Kd.Ütğm

TIPTA UZMANLIK TEZİ

ANKARA
2006

T.C.
GENELKURMAY BAŐKANLIĐI
GÜLHANE ASKERİ TIP AKADEMİSİ
ASKERİ TIP FAKÜLTESİ
BİYOKİMYA VE KLİNİK BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
BAŐKANLIĐI

YAŞLANMAYA BAĞLI PARAOKSONAZ ENZİM
AKTİVİTESİNDEKİ DEĞİŞİMLER

Ercan SARUHAN
Dz.Tbp.Kd.Ütğm

Gülhane Askeri Tıp Akademisi
Askeri Tıp Fakóltesi'nin
Biyokimya ve Klinik Biyokimya Programı
İçin Öngördüğü
TIPTA UZMANLIK TEZİ
olarak hazırlanmıştır.

TEZ DANIŞMANI
Şerif AKMAN
Prof.Ecz.Kd.Alb.

Ankara
2006

GATA Askeri Tıp Fakóltesi Dekanlığına:

“Yaşlanmaya bağı Paraoksonaz Enzim Aktivitesindeki Değışimler” konulu bu çalışma jürimiz tarafından Biyokimya ve Klinik Biyokimya Anabilim Dalı’nda Tıpta Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı : Prof.Ecz.Kd.Alb. Şerif AKMAN

Üye : Prof.Tbp.Tuğg. Selahattin ERİKÇİ

Üye : Prof.Dr.Ecz.Kd.Alb. M.Kemal ERBİL

Üye : Prof.Ecz.Kd.Alb. İsmail KURT

Üye : Doç.Tbp.Kd.Alb. Mustafa ÖZKAN

ONAY:

Dz.Tbp.Kd.Ütğm. Ercan SARUHAN’ın 09/10/2006 tarihinde savunduğı bu tez Akademi Kurulu’nca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görölmüş ve kabul edilmiştir.

Zeki BAYRAKTAR

Prof.Tbp.Tümgeneral

Komutan Bilimsel Yardımcısı

As.Tıp.Fak.Dek. ve Eğıt.Hst.Bşıtp.

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışması, Gülhane Askeri Tıp Akademisi ve Askeri Tıp Fakültesi 15 Temmuz 2004 gün ve 07 sayılı kararı gereği Biyokimya ve Klinik Biyokimya Ana Bilim Dalı Başkanlığında yapılmıştır.

Bu çalışmada yaşlanmaya bağlı artan oksidan hasarın Paraoksonaz enzim aktivitesi üzerine etkilerinin araştırılması hedeflenmiştir.

Uzmanlık eğitimim süresince yetişmemde büyük katkıları bulunan, ayrıca tez danışmanlığımı yaparak benden yardımlarını hiç eksik etmeyen, beni yönlendiren ve destek olan değerli hocam Prof.Ecz.Kd.Alb. Şerif AKMAN'a ve diğer hocalarım Prof.Dr.Ecz.Kd.Alb. M.Kemal ERBİL'e, Prof.Ecz.Kd.Alb. İsmail KURT'a, Prof.Ecz.Kd.Alb. Cumhur BİLGİ'ye, Doç.Tbp.Yb. Taner ÖZGÜRTAŞ'a, Doç.Dz.Tbp.Yb. Muhittin SERDAR'a minnet ve şükranlarımı sunarım.

Çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen Uz.Tbp.Alb. Adnan HAŞİMİ'ye, Yrd.Doç.Tbp.Kd.Bnb. Abdullah OLGUN'a, Yrd.Doç.Dz.Tbp.Bnb. Erdiñ ÇAKIR'a, Yrd.Doç.Dz.Tbp.Bnb. Halil YAMAN'a, çalışma arkadaşlarım Tbp.Kd.Ütğm. Murat CİHAN'a, Hv.Tbp.Yzb. Dilek ABASLI'ya, Tbp.Kd.Ütğm. Yasemin KURT'a, Tbp.Yzb. Özgür AVCI'ya, Tbp.Ütğm. Levent KOÇU'ya, Biyolog Dr. Kamile ÖZTÜRK'e, tezin istatistiksel analizlerinin yapılmasındaki katkılarından dolayı Doç.Tbp.Bnb. Selim KILIÇ'a, uzmanlık eğitimim boyunca göstermiş olduğu sabır, anlayış ve desteklerinden dolayı eşim Esra Çiğdem SARUHAN'a, evimizin neşe kaynağı oğlum Yiğit'e ve Biyokimya ve Klinik Biyokimya A.D. Başkanlığında birlikte görev yaptığım tüm bölüm personeline desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Dr. Ercan SARUHAN

ANKARA-2006

ÖZET

Yaşlanmaya bağlı Paraoksonaz Enzim Aktivitesindeki Değişimler

Yaşlanma ile kardiyovasküler hastalıkların görülme insidansı artmaktadır. Kardiyovasküler hastalıkların altında yatan en önemli patoloji ateroskleroz gelişimidir. Kardiyovasküler hastalıkların en önemli risk faktörlerinden biri hiperkolesterolemi ve buna bağlı görülen düşük dansiteli lipoproteinlerin (LDL) oksidasyonudur. Okside LDL inflamatuvar bir süreci başlatarak aterosklerotik plakların oluşmasına neden olur. HDL aterosklerozun başlangıç ve gelişiminden sorumlu tutulan LDL'deki oksidatif değişimleri önler. HDL'nin antioksidan etkisinin kısmen HDL ile ilişkili enzimlere bağlı olabileceği düşünülmekte, özellikle paraoksonaz (PON) enzimi üzerinde durulmaktadır. İnsan serum PON enzimi 43 kDa ağırlığında bir glikoproteindir ve insan serumunda HDL ile birlikte taşınır. PON1 bakır ve diğer serbest radikal üreticilerinin oluşturduğu oksidatif hasara karşı LDL ve HDL kolesterolü koruyarak aterosklerotik süreci engellemektedir. Bu koruma PON1'in bazı aktif fosfolipidleri ve lipid peroksit ürünlerini hidrolize etmesi ile gerçekleşir. PON1 aktivitesi hiperkolesterolemi, diabetes mellitus, kronik böbrek yetmezliği ve kardiyak hastalıklarda azaldığı yapılan çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Normal HDL seviyelerine rağmen düşük PON1 serum aktivitesinin, HDL'nin LDL'yi oksidasyondan koruyucu etkisinin azalmasına, böylece koroner ateroskleroz insidansının artmasına yol açmaktadır. PON1 aktivitesinin lipid peroksidasyonundan koruyucu rolü nedeniyle biz de PON1 aktivitesinin yaşlanmaya bağlı olarak azalacağı hipoteziyle farklı yaş gruplarında PON1 aktivitesini inceledik. Ayrıca yaşlanma ile birlikte PON1 fenotip insidansını ve diğer biyokimyasal değişimleri araştırdık. Sonuç olarak HDL oksidasyonunun PON1 ve arilesteraz aktivitesi üzerine etkisini araştırmayı amaçladık.

Anahtar Kelimeler : Paraoksonaz, Yaşlanma, HDL

Destekleyen Kurumlar : Gülhane Askeri Tıp Akademisi

Yazar Adı : Dz.Tbp.Kd.Ütğm. Ercan SARUHAN

Danışman : Prof.Ecz.Kd.Alb. Şerif AKMAN

SUMMARY

Age related Paraoxonase activity changes in Turkish population

There is a dramatic increase of cardiovascular diseases with aging and it could be due to the development of atherosclerosis and increased susceptibility of LDL and HDL to oxidation. Atherosclerosis and related diseases, stroke and CVD, constitute an important cause of mortality and morbidity in industrialized countries. Oxidized LDL initiate an inflammatory process, which ultimately leads to the formation of atherosclerotic plaques. PON1 is a Ca dependent 43 kDa glycoprotein that is associated with HDL in human serum. PON1 has been demonstrated to be implicated in the protection of LDL and HDL from oxidation induced by copper ions as well as by other free radical generators. This protection is most probably related to the PON1 hydrolyzing activity of some activated phospholipids and lipid peroxide products. PON1 activity has been demonstrated to be reduced in pathologies associated with atherosclerosis, e.g. CVD, diabetes and chronic renal failure. A reduction in the antioxidant potential of PON1 might also influence the susceptibility of lipoproteins to oxidation and may affect the antioxidant properties of HDL. Therefore the risk of coronary atherosclerosis development increases. The aim of this study was to investigate, with aging, the activity of paraoxonase (PON1) associated to HDL and responsible for its anti-atherogenic activity. We also investigated the incidence of PON1 phenotype and other biochemical parameters. Finally, we aimed to investigate the effect of HDL oxidation on PON1 and arylesterase activity.

Keywords : Paraoxonase, Aging, HDL

Supported by : Gulhane Military Medical Academy

Author : Ercan SARUHAN, MD

Counsellor : Professor Serif AKMAN

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	i
TEŞEKKÜR	ii
ÖZET	iii
İNGİLİZCE ÖZET	iv
İÇİNDEKİLER	v
SİMGELER ve KISALTMALAR	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
TABLolar DİZİNİ	ix
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	3
2.1. Paraoksonaz Enzimi	3
2.2. Tarihçe	4
2.3. Paraoksonaz Gen Ailesi	5
2.4. PON Polimorfizmleri	5
2.5. Paraoksonazların Yapısı	10
2.6. PON1 Sentezi	16
2.7. PON1 Salınımı ve Hücre Membranlarıyla Etkileşimi	17
2.8. PON1 Stabilitesi	19
2.9. PON1'in Biyokimyasal Fonksiyonları	20
2.10. PON1 ve HDL	25
2.11. PON1 ve LDL	27
2.12. PON1 ve Ateroskleroz	30
2.13. Homosistein Metabolizmasında PON1'in Rolü	32

2.14. PON Salınımını Etkileyen Faktörler	32
2.15. Çeşitli Hastalıklarda PON	37
2.16. Ölçüm Yöntemleri	39
GEREÇ VE YÖNTEM	42
3.1. Gereçler	42
3.2. Yöntemler	42
BULGULAR	49
TARTISMA	56
SONUÇ VE ÖNERİLER	59
KAYNAKLAR	60

SİMGELER VE KISALTMALAR

GATA : Gülhane Askeri Tıp Akademisi

PON: Paraoksonaz

PAF: Platelet aktive edici faktör

PAFAH: Platelet aktive edici faktör asetilhidrolaz

ARE: Arilesteraz

KAH: Koroner arter hastalığı

LDL: Düşük dansiteli lipoprotein

HDL: Yüksek dansiteli lipoprotein

Apo AI: Apolipoprotein AI

SREBP-2: Sterol regulatory element-binding protein-2

CHO: Çin-hamster overi

SR-B1: Scavenger reseptör B1

LCAT: Lesitin kolesterol açıl transferaz

TBARS: Tiyobarbitürik asit ile reaksiyona giren maddeler

LPS: Lipopolisakkarid

H₂O₂: Hidrojen peroksit

ROS: Reaktif oksijen türü

OP: Organofosfat

AhR: Aril hidrokarbon reseptörü

XRE: Ksenobiyotik yanıt elementi

SAA: Serum amiloid A

CETP: Kolesterol ester transfer protein

TNF: Tümör nekroz faktör

IL-1: İnterlökin-1

X : Aritmetik Ortalama

SD : Standart Sapma

r : Korelasyon Katsayısı

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
2.1 HDL'nin yapısı ve PON1'in yerleşimi	3
2.2 PON1 geninin kodlayıcı bölgesi	9
2.3 İnsan Serum Paraoksonaz (PON 1) Enziminin Yapısı	10
2.4 İnsan PON proteinlerinin aminoasit dizileri ve karşılaştırılması	12
2.5 PON1 proteininin üç boyutlu genel yapısı	13
2.6 PON1'in katalitik bölgesi ve etki mekanizması	14
2.7 Promotor ve kodlayıcı bölgelerdeki polimorfizmler ve bunların konsantrasyon ve aktivite üzerine etkileri	16
2.8 PON1'in hücreden HDL'ye bağlanarak salınımı	19
2.9 PON1'in enzimatik aktiviteleri ve substratları	21
2.10 PON1'in HDL yüzeyine bağlanması	27
2.11 PON1 salınımı, HDL ile ilişkisi ve lipid hasarının olduğu bölgelere taşınması	30
2.12 Paraoksonaz aktivite tayininde kullanılan substratlar	40
4.1 Serum total kolesterol seviyelerinin yaşa bağlı değişimi	51
4.2 Serum HDL kolesterol seviyelerinin yaşa bağlı değişimi	52
4.3 Serum paraoksonaz aktivitesinin yaşa bağlı değişimi	52
4.4 Serum arilesteraz aktivitesinin yaşa bağlı değişimi	53
4.5 1 M NaCl varlığında paraoksonaz aktivitesinin yaşa bağlı değişimi	53
4.6 Farklı yaş gruplarında paraoksonaz, 1 M tuzla uyarılmış paraoksonaz ve arilesteraz aktivitelerinin dağılımı	54

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo		Sayfa
2.1	Saflaştırılmış PON1 ₁₉₂ izoformları tarafından hidrolize edilen substratların kinetik analizleri	6
2.2	Lipid bileşikleri ve apolipoproteinlerin PON1 salınımına etkisi	18
2.3	HDL ile ilişkili enzimler	22
4.1	Grupların demografik özellikleri, lipid parametreleri, paraoksonaz ve arilesteraz aktiviteleri	50
4.2	Sigara içen ve içmeyenlerin lipid parametreleri, paraoksonaz ve arilesteraz aktiviteleri	51
4.3	Üç farklı PON1 polimorfizminin gruplar arasında dağılımı	55

1. GİRİŞ

Yaşlanma ile kardiyovasküler hastalıkların görülme insidansı artmaktadır. Kardiyovasküler hastalıklar endüstrileşmiş ülkelerde başlıca mortalite ve morbidite nedenidir. Kalp ve beyin gibi yaşamsal organları besleyen damarlarda aterosklerotik lezyonlar sonucu gelişen bu hastalıklar, 2005 yılında yayınlanan Avrupa kardiyovasküler hastalık istatistiklerine göre Avrupa'daki ölümlerin yaklaşık yarısının sebebini oluşturmaktadır.

Kardiyovasküler hastalıkların altında yatan en önemli patoloji ateroskleroz gelişimidir. Kardiyovasküler hastalıkların en önemli risk faktörlerinden biri hiperkolesterolemi ve buna bağlı görülen düşük dansiteli lipoproteinlerin (LDL) oksidasyonudur. Okside LDL inflamatuvar bir süreci başlatarak aterosklerotik plakların oluşmasına neden olur. Yüksek dansiteli lipoproteinlerin (HDL) anti-aterojenik özelliklere sahip olduğu ve ateroskleroz gelişimi ile ters bir korelasyon gösterdiği uzun yıllardır bilinmektedir. Serum total kolesterol ve düşük yoğunluklu lipoprotein düzeylerinin yüksek; buna karşılık HDL düzeylerinin düşük olması, aterosklerotik kalp hastalığı için risk faktörü olarak değerlendirilmektedir. Framingham çalışması ve diğer büyük ölçekli çalışmalardan elde edilen bulgular, HDL kolesterolün neden olduğu risk artışının, total kolesterol ve LDL kolesterolden bağımsız olduğunu göstermiştir. Başlangıçta HDL'nin "ters-kolesterol transportu" sistemindeki rolü üzerinde yoğunlaşıldı. Ancak HDL'nin aterosklerozdaki koruyucu rolü, ters kolesterol taşınması ile sınırlı değildir. HDL aynı zamanda nitrik oksit gibi bazı damar genişletici moleküllerin sentezini artırır, inflamasyonu ve tromboz oluşumunu önleyici etki gösterir, adezyon moleküllerinin sentezini azaltır ve endotel tamirini uyarır. HDL'nin bir başka önemli etkisi ise, aterosklerozun başlangıç ve gelişiminden sorumlu tutulan LDL'deki oksidatif değişimleri önlemesidir. HDL'nin antioksidan etkisinin kısmen HDL ile ilişkili enzimlere bağlı olabileceği düşünülmekte, özellikle paraoksonaz (PON) ve platelet aktive edici faktör asetilhidrolaz (PAFAH) enzimleri üzerinde durulmaktadır.

İnsan serum PON enzimi 43 kDa ağırlığında bir glikoproteindir ve insan serumunda HDL ile birlikte taşınır. PON aktivitesi genetik ve diyetle regüle edilmektedir. PON, bakır ve diğer serbest radikal üreticilerinin

oluşturduğu oksidatif hasara karşı LDL ve HDL kolesterolü koruyarak aterosklerotik süreci engellemektedir. Bu koruma PON'un bazı aktif fosfolipidleri ve lipid peroksit ürünlerini hidrolize etmesi ile gerçekleşir. In vitro çalışmalarda bakır tarafından lipid peroksidasyonunun gerçekleştirilebilmesi için eser miktarda lipid peroksitlere ihtiyaç vardır. PON aktivitesi lipid peroksitlerin varlığında inhibe olmaktadır.

PON aktivitesi hiperkolesterolemi, diabetes mellitus, kronik böbrek yetmezliđi ve kardiyak hastalıklarda azaldıđı yapılan çeřitli çalıřmalarda gösterilmiřtir. Normal HDL seviyelerine rađmen dūřuk PON serum aktivitesinin, HDL'nin LDL'yi oksidasyondan koruyucu etkisinin azalmasına, böylece koroner ateroskleroz insidansının artmasına yol açmaktadır. Bu sonuçlara dayanarak azalmıř PON aktivitesinin gelecekte, ateroskleroz riskini belirlemede, kolesterol ve HDL seviyesinden daha iyi bir belirteç olabileceđi ileri sūrūlmektedir.

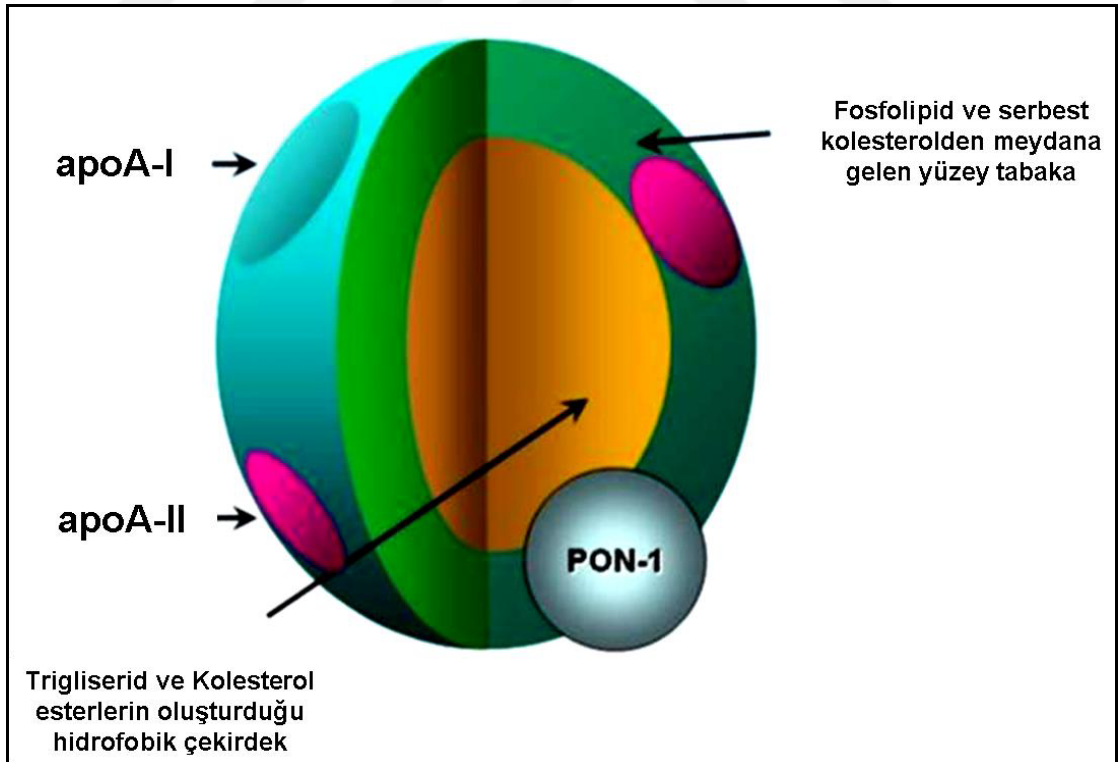
Yařlanma ile dolařımdaki akut faz reaktanı olan C-reaktif protein seviyeleri yūkselir ve inflamatuvar bir durum gelişir. Bu inflamatuvar sūre kardiyovasküler hastalıklar için bir risk faktrū oluřturur. Bu biyokimyasal modifikasyonlar PON1 aktivitesini etkileyebilir. İnfluenza gibi akut infeksiyonlarda PON1 aktivitesi azalmaktadır. Geçmiř yıllarda yapılan çalıřmalarda yařlanma ile LDL ve HDL oksidasyonunun arttıđı gösterilmiřtir.

PON1 aktivitesinin lipid peroksidasyonundan koruyucu rolū nedeniyle biz de PON1 aktivitesinin yaşlanmaya bağlı olarak azalacağı hipoteziyle farklı yař gruplarında PON1 aktivitesini inceledik. Ayrıca yaşlanma ile birlikte PON1 fenotip insidansını ve diğer biyokimyasal değişimleri araştırdık. Sonuç olarak HDL oksidasyonunun PON1 aktivitesi üzerine etkisini araştırmayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Paraoksonaz Enzimi

Paraoksonaz (PON) karaciğerde sentezlenen, organik fosforlu bir insektisit olan parationun aktif metaboliti paraoksonu hidroliz etme yeteneğine sahip, Aldridge sınıflama sistemine göre A grubu arildialkilfosfataz sınıfı ester hidrolaz enzimidir (arildialkil fosfataz; organofosfat hidrolaz; paraokson hidrolaz; [EC 3.1.8.1]) (1,2). PON1 aynı zamanda fenilasetat gibi aromatik esterleri de hidrolize etmesi nedeniyle “A esteraz” olarak da tanımlanmıştır (arilesteraz aktivitesi, EC 3.1.1.2) (2,3). Enzim, paraokson, metil paraokson ve klormetil paraoksone yüksek derecede seçicilik gösterdiği için, paraoksonaz olarak adlandırılmıştır. Geçmişte organofosfatlı bileşiklerin hidroliz etme özelliği nedeni ile toksikoloji alanında çalışılmış, son yıllarda ise antioksidan etkileri nedeni ile koroner arter hastalıkları (KAH) riskinden koruyabileceği düşünülerek güncellik kazanmıştır.



Şekil 2.1. HDL'nin yapısı ve PON1'in yerleşimi

2.2. Tarihçe

Paraoksonaz enzimi, ilk olarak 1946 yılında Abraham Mazur tarafından hayvan dokularında organofosfatlı bileşikler hidrolize eden bir enzimin varlığının tespit edilmesiyle ortaya çıkmıştır (4). Bu çalışma 1950'lerin başında paraoksonazın ilk kez tanımlanmasını sağlamıştır. Alridge insan ve hayvan serumlarında paraoksonun hidrolizini çalışmıştır (3,5). Alridge organofosfatları ve p-nitrofenil asetat gibi aromatik esterleri hidrolize eden bu esterazların diğer "B esteraz"lardan ayrılması için "A esteraz" olarak adlandırılmasını önerdi.

İnsan serumunda ilk kez 1961'de Uriel tarafından elektroforez sonrası HDL immunopresipitatlarında saptanmıştır (6). 1973 yılında bir grup Alman araştırmacı, ilk olarak insan serum paraoksonazı genetik olarak saptamışlardır (7). Mackness ve ark. (8), PON'un HDL üzerinde apolipoprotein AI'e (apo AI) bağımlı olarak aktivite gösterdiğini ve 1991 yılında LDL üzerindeki lipoperoksit birikimini azalttığını bulmuşlardır. İmmünoaffinite kromatografi çalışmaları insan serum paraoksonazının gerçekte apo AI ve klusterin (apolipoprotein J) içeren HDL tipleri ile ilişkili olduğunu ve PON'un total HDL'nin çok küçük bir bölümünü oluşturduğunu göstermiştir (9).

Paraoksonaz ve arilesteraz aktivitelerinin tek bir enzimin mi yoksa iki farklı enzimin aktiviteleri mi olduğu yıllarca tartışılması sonucunda her iki aktivitenin de PON'dan kaynaklandığı gösterilmiştir (10). Mackness ve ark. PON'un LDL'de lipoperoksitlerin birikimini engelleyerek kardiyovasküler hastalıklarda koruyucu rolünü ortaya koymasından sonra bilimsel çevrelerin daha fazla ilgisini çekmiştir (11).

Yakın tarihimizde Körfez savaşı sırasında, Irak'a gönderilen Amerikan askerlerinde "Körfez Savaşı Sendromu" belirtileri olan yorgunluk, kas güçsüzlüğü ve nörolojik hasarlar bazı askerlerde görülürken, diğer askerlerde sendrom belirtilerine rastlanmamıştır. PON enziminin, Irak tarafından kimyasal silah olarak kullanıldığı düşünülen sarin, diazokson gibi organofosforlu bileşikler detoksifiye ettiğinin anlaşılmasından sonra körfez savaşına katılmış olan askerlerin PON aktiviteleri araştırılmış ve körfez savaşı sendromu olan hastalarda PON aktivitesi oldukça düşük bulunmuştur.

Günümüze kadar yapılan birçok çalışmada, farklı kardiyovasküler hastalıklarda enzim aktiviteleri incelenmiş, lipoproteinlerle ve lipid peroksidasyonu arasındaki ilişkisi araştırılmış, enzimin aminoasit dizisi belirlenmiştir.

2.3. Paraoksonaz Gen Ailesi

Memeli türleri arasında geniş bir dağılıma sahip olan PON proteinleri, balıklarda, kuşlarda ve eklembacaklılar gibi omurgasızlarda mevcut değildir (3). Memelilerde bulunan paraoksonaz gen ailesi PON1, PON2 ve PON3 olmak üzere 3 üyeden oluşur. Yapısal benzerlik gösteren bu genler farelerde 6. kromozom üzerinde, insanlarda 7. kromozomun uzun kolunda, q 21.3 ile q 21.1 bölgesinde lokalize oldukları in-situ hibridizasyon çalışmaları ile gösterilmiştir (12). Gelişimsel açıdan bakıldığında, gen duplikasyonu sonucu oluşan ve yapısal benzerlik gösteren genlerdir. PON1, PON2 ve PON3 genlerinin memeliler arasında; nükleotid seviyesinde benzerlikleri %81-90 iken aminoasit seviyesindeki benzerlikleri %79-90 dır. PON1'de 105. kodonda lizin bulunurken, PON2 ve PON3'te lizin bulunmamaktadır. PON2 ve PON3'ün 105. pozisyonda lizin rezidüsü bulunmadığından paraoksonu hidroliz edemedikleri öne sürülmüştür. Ayrıca PON2 ve PON3 plazmada bulunmamaktadır (13).

2.4. PON Polimorfizmleri

Paraoksonaz polimorfizm gösteren bir enzim olup; başlıca kodlayıcı bölge ve promotor polimorfizmleri bulunmaktadır.

2.4.1. PON1 Kodlayıcı Bölge Polimorfizmleri

PON1'in kodlama yapan bölgesinde 192. pozisyondaki Glutamin'in Arginin'e dönüşümü ve 55. pozisyondaki Lösin'in Methionin'e dönüşümünü içeren iki farklı polimorfizm vardır [Gln 192-Arg (Q 192 R) ve Leu 55-Met (L 55 M)]. Q192 R polimorfizmi çok yaygın çalışılmıştır. Çünkü iki alloenzimin birçok substrata karşı afinitesi ve katalitik aktivitesi birbirinden farklıdır (Tablo 2.1). PON1 192 R alloenzimi paraoksonu Q formuna göre sekiz kez daha

hızlı hidroliz ederken, Q formu sarin, soman ve diazokson'a karşı daha aktiftir. Tek bir amino asit değişiminin neden olduğu bu önemli farklılığın nedeni enzim yapısındaki değişim ile açıklanabilir. Belirli organofosfatlara karşı aktivitedeki bu farklılık PON1'in bazı toksik substratlara karşı duyarlılığını etkilediği için önemlidir. Q 192 R polimorfizmi aynı zamanda enzimin LDL'yi oksidanlardan koruma özelliğini de değiştirir.

PON 55M polimorfizmi PON1'in substratları ile ilişkisini etkilemez ancak enzim konsantrasyonunu ve serumdaki aktivitesinin daha da düşmesine neden olur. M allelini taşıyan bireylerde PON1 mRNA seviyesinin daha düşük olduğu bulunmuştur. Dizi analizi ile yapılan çalışmalarda bu genin promotorunda C(-108)T polimorfizmi olduğu saptanmış olmasına karşın, L55M etkisinin tamamen bu polimorfizmle açıklanması mümkün değildir (14-17).

L 55 izoformunun daha stabil ve proteolize karşı daha dirençli olması (18) serumdaki yüksek PON1 seviyesini açıklayabilir. PON1'in kristal yapısı ile ilgili son zamanlardaki yayınlar, proteinin doğru bir şekilde paketlenmesinde L 55'in anahtar bir rol aldığını göstermektedir (19).

Tablo 2.1. Saflaştırılmış PON1₁₉₂ izoformları tarafından hidrolize edilen substratların kinetik analizleri (20)

Substrate	PON1 _{192Q}			PON1 _{192R}		
	V_{max} (units/mg)	K_m (mM)	V_{max}/K_m	V_{max} (units/mg)	K_m (mM)	V_{max}/K_m
Phenylacetate	845	0.69	1225	720	0.27	2700
Paraoxon	0.47	0.5	0.94	2.1	0.27	7.8
Diazoxon	222	2.98	75	79	1.02	77
Chlorpyrifos-oxon	82	0.54	152	64	0.25	256
Sarin	69	0.21	330	21	0.31	68
Soman	82	0.42	195	31	0.25	124
γ -Butyrolactone	420	15	23	290	5.3	55
Dihydrocoumarin	180	0.022	8200	160	0.013	12 300

2.4.2. PON1 Kodlayıcı Bölge Polimorfizmleri ve KAH

LDL'nin oksidanlardan korunmasında polimorfik formların farklılığını temel alan ve bu farklılığın KAH oluşma riskine etkisini saptamaya yönelik birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar oldukça çelişkilidir. PON1 192R yada PON1 55M ve KAH arasındaki ilişkiyi gösteren bir çok çalışma yapılmıştır (21). Bu çalışmalarda farklı populasyonlardan az sayıda hasta seçilmesi, farklı genotiplendirme metodları kullanılması Q192R ve L55M polimorfizmleri ile KAH arasında güçlü bir ilişki kurulmasını engellemektedir (22). Bu sonuçlara göre PON1 genetik polimorfizmleri ile KAH arasında en iyi ihtimalle zayıf bir ilişki bulunmaktadır. Serum PON1 aktivite ve konsantrasyonlarını etkileyen bireylerarası geniş farklılıklar gibi faktörler PON1'in KAH'ndan koruyucu etkisinde daha önemli roller oynamaktadır.

2.4.3. PON1 Promotor Polimorfizmleri

PON1 geninin promotor bölgesinin sekanslanması sonucunda gen ekspresyonunu farklı oranlarda etkileyen en az beş polimorfizm saptanmıştır. Bu polimorfizmler -909/907 (C veya G), -832/824 (A veya G), -162 (A veya G), -126 (C veya G) ve -108/-107 (C veya T) pozisyonlarında yer almaktadır (Şekil 2.2A) (18,23,24). İsimlendirme farklılıkları çalışılan sekanslardaki bazı küçük değişimlerden kaynaklanmaktadır. İsimlendirmeyi basitleştirmek için polimorfizmler -909, -832 ve -108 olarak gösterilmiştir.

HepG2 hücrelerinde yapılan lusiferaz gen çalışmalarında promotor bölgesinde -909, -832, -162 ve -108. pozisyonlarda GAAC ve antikodonu olan CGGT polimorfizmi bulunan promotorun iki kat daha aktif olduğu gösterilmiştir (18,23,24). Promotor aktivitesindeki bu değişimlerin serum PON1 konsantrasyonu ve aktivitesinde önemli değişikliklere yol açtığı gösterilmiştir (18,22,24). PON1 geninin translasyona uğramayan 3' bölgesinde de bazı polimorfizmler saptanmasına rağmen bunların önemi henüz bilinmemektedir (23).

Klinik olarak önemli polimorfizmlerin saptanması tüm promotor polimorfizmleri arasındaki çelişki nedeniyle mümkün olmamaktadır. İki

populasyonun haplotip analizi sonucunda C(-108)T polimorfizmi serum PON1 değişimlerinin ana sorumlusudur (total değişimin yaklaşık %23-24'ü) (24,25). Brophy ve ark. (23) A(-162)G polimorfizminin az da olsa bu değişimlerden sorumlu olduğunu göstermişlerdir (%1.1). -909 ve -832 polimorfizmlerinin serum PON1 seviyelerine etkisi çok az veya hiç yoktur (24,25).

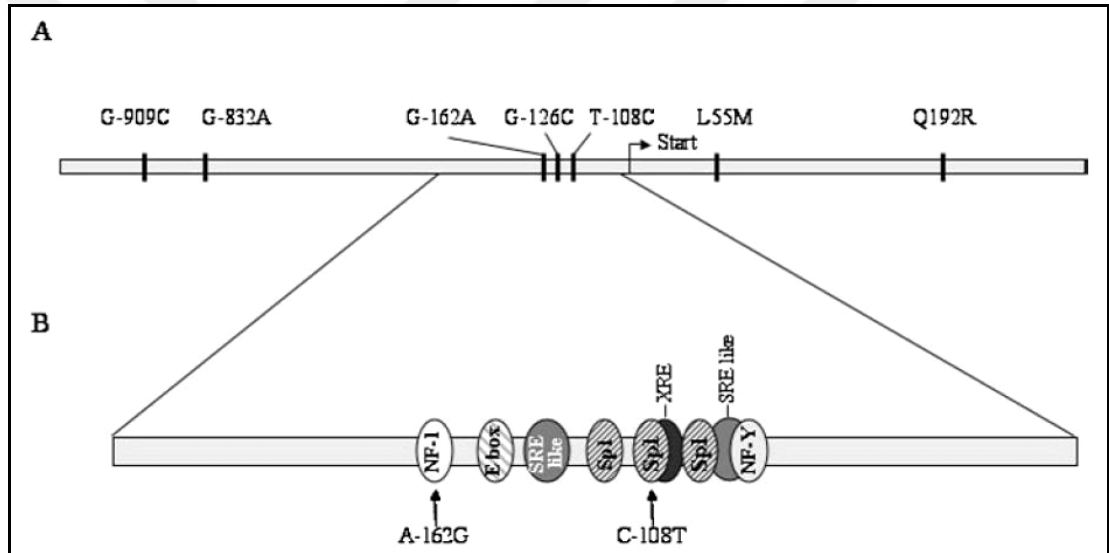
Farklı uzunluklarda promotor bölge kullanan reporter gen analizlerinde PON1 geninin transkripsiyonu için -108 ve -162 polimorfizmlerini kapsayan yaklaşık 200 baz çiftlik bölgenin yeterli olduğu gösterilmiştir (18,26,27). Bu bölgenin silinmesi ile promotor aktivitenin tamamen kaybolması PON1 promotorun düzenleyici bölgesi için ne kadar önemli bir bölge olduğunu göstermektedir (27).

-108 bölgesi serum PON1 değişimlerinin başlıca belirleyicisi olmasına rağmen bu konuda daha fazla çalışma yapılmalıdır. Polimorfizm transkripsiyon faktör Sp1 ve Sp3'ün bağlanma bölgelerinin merkezinde yer alır. Bu ortak bölge -108T varyantın varlığında kaybolur (16,23). Sp1'in -108 bölgesine bağlanması C yerine T bulunması durumunda daha zayıf olmaktadır, bu da polimorfizmin Sp1 bağlanması üzerine olan etkisini göstermektedir (27). PON1 promotorunda birçok Sp1 bölgesi yer alır bu nedenle polimorfizmin etkisi pozisyoneldir. PON1 promotorunun Sp1 eksprese eden bir plazmid ile transfeksiyonu sonucunda promotor aktivitesi güçlü bir şekilde uyarılır. Bu çalışma ile Sp1'in PON1 ekspresyonu için ne kadar önemli olduğu gösterilmiştir (28).

Promotor polimorfizmleri ile kodlayıcı bölge L55M polimorfizmleri arasında önemli bir çelişki mevcuttur. Brophy ve ark. (23) KAH'ndan daha düşük koruyucu rolü olan -108C ve R192 kodlayıcı bölge polimorfizmleri arasında çelişki saptamışlardır. Q192R polimorfizmi enzim aktivitesindeki değişimlerden tek başına sorumlu olmasına rağmen -108C polimorfizmi ve PON192R polimorfizminin KAH'ndan düşük koruyucu rolünü kompanse edebilmektedir. Bu sonuçlar PON1 genotipi ile hastalıklar arasındaki ilişkiyi güçleştirmektedir (23).

2.4.4. PON1 Promotor Polimorfizmleri ve KAH

PON1 promotor polimorfizmlerinin hastalıklardaki rolü kesin değildir. Bir kaç epidemiyolojik çalışmada PONC(-108)T polimorfizminin vasküler hastalık gelişimi üzerine etkileri araştırılmıştır. Genç populasyonlarda ve tip II diabetli hastalarda düşük aktiviteli T alleli ile vasküler hastalıklar arasında pozitif bir ilişki bulunmuştur (29-32). Yaşlı populasyonlar ve hiperkolesterolemik hastalarda yapılan çalışmalarda ise PON1 polimorfizmleri ile hastalıklar arasında herhangi bir ilişki bulunamamıştır (33,34). Bir kaç çalışmanın meta analizinde -108 polimorfizmi ile KAH arasında önemli bir ilişki bulunamamıştır (22).



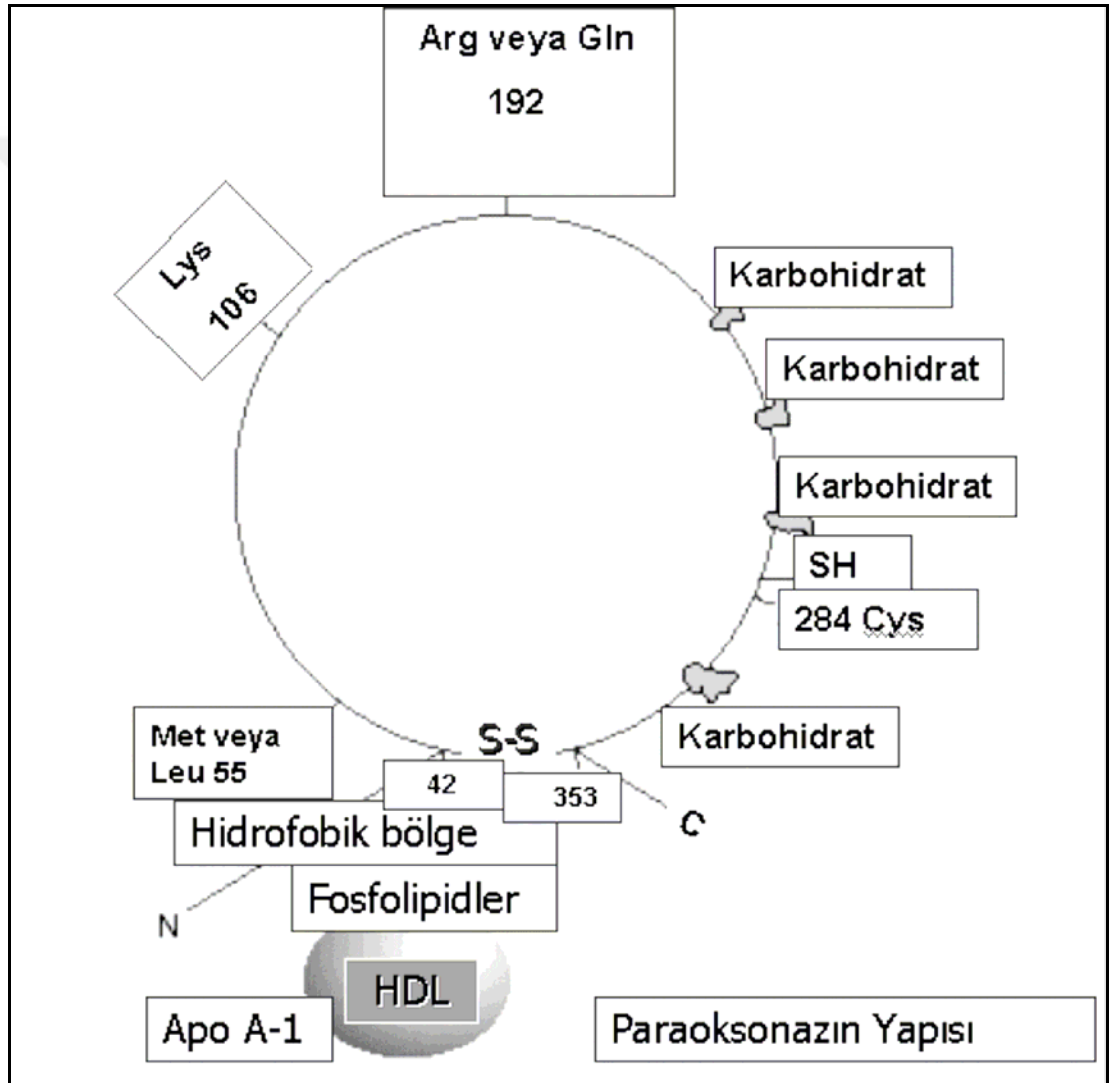
Şekil 2.2. PON1 geninin kodlayıcı bölgesi (20).

(A) PON1 geninin promotor ve kodlayıcı bölgesindeki polimorfizmlerin yerleşimi. (B) PON1 geninin transkripsiyonu için gerekli olan 200 baz çiftlik promotor bölgesinin büyütülmüş resmi. -162 ve -108 polimorfizmleri ve potansiyel transkripsiyon faktör bağlanma bölgeleri işaretlenmiştir. (NF-1, nükleer faktör-1; NF-Y, nükleer faktör-Y)

2.5. Paraoksonazların Yapısı

2.5.1. PON1

İnsan serum paraoksonazı, Ca^{+2} (kalsiyum) bağımlı, 43 kDa molekül ağırlığında, 354 aminoasitten oluşan ve ağırlığının %15.8'ni oluşturan üç karbonhidrat zinciri içeren bir glikoprotein olup fiziksel olarak HDL'ye bağlı olarak bulunur (9). İzoelektrik noktası 5.1'dir. Paraoksonaz enziminin yapısı Şekil 2.3'de gösterilmiştir.



Şekil 2.3. İnsan Serum Paraoksonaz (PON 1) Enziminin Yapısı (35).

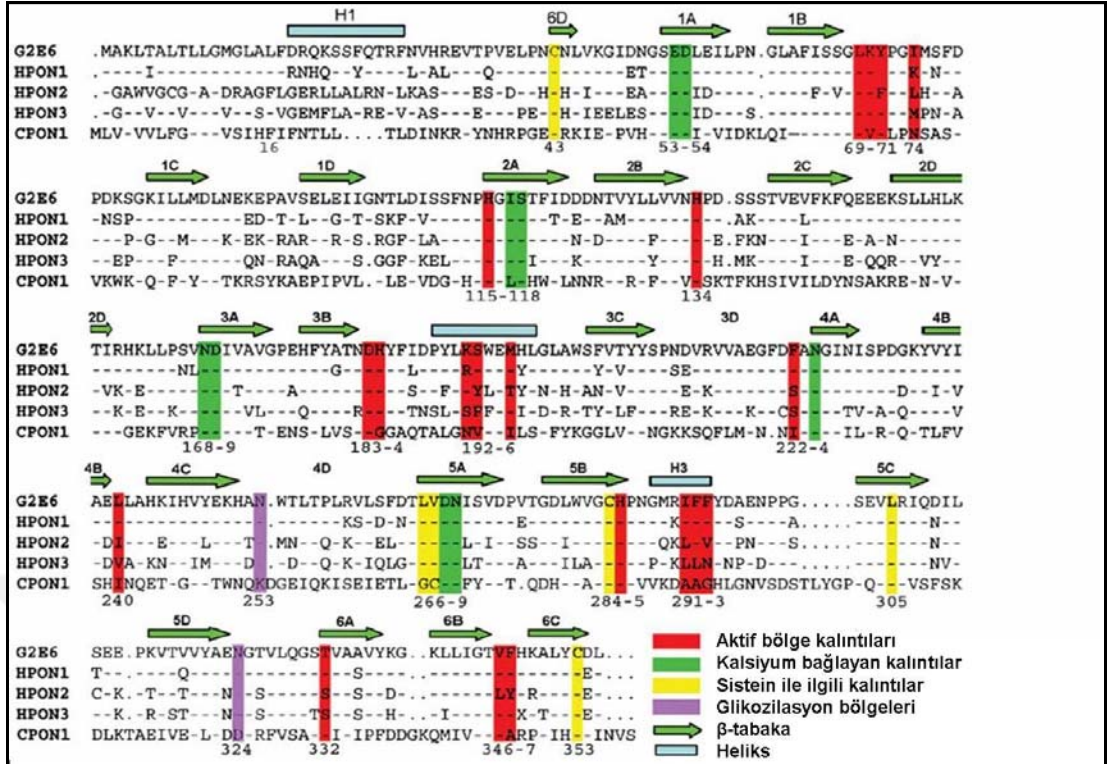
Serum PON1'in büyük bir çoğunluğu HDL ile birlikte bulunur. Şilomikron ve VLDL'nin düşük düzeyde de olsa PON1 içerdiği fakat LDL'nin

PON1 içermediği gözlenmiştir. PON3 de HDL ile ilişkili bir enzimdir. PON2'nin ise HDL ile ilişkisi bulunmamaktadır.

Paraoksonaz enzimi başlıca karaciğerde sentezlenir ve seruma salınır. Ayrıca böbrek, ince bağırsak başta olmak üzere birçok dokuda ve serumda bulunur (36). PON1 dizi analizi için BLASTN kullanılarak yapılan GenBank çalışmasında akciğer, beyin, karaciğer, pankreas ve plasentada tespit edilen eksprese dizi fişlerinin (EST) paraoksonaz ile %70 uyumlu olduğu gösterilmiştir. Bu sonuçlar serumdaki PON1 kaynaklarını açıklamaktadır. Çeşitli insan ve tavşan dokularının Northern blot analizlerinde PON1 mRNA sadece karaciğer dokusunda tespit edilebilmiştir. Buna rağmen daha hassas bir teknik olan RT-PCR kullanılarak yapılan çalışmalarda PON1 mRNA fare karaciğer, akciğer, kalp, beyin, ince barsak ve böbreğinde de tespit edilmiştir.

Tavşan ve insan cDNA klonlarında %86, nükleotid dizilerinde ise %85 benzerlik görülmektedir. Ayrıca fare ve insan PON1 gen dizilerinde ve yapısında büyük oranda benzerlik mevcuttur. Bu benzerlik PON1'in önemli bir metabolik role sahip olduğunu ve evrimsel olarak korunduğunu göstermektedir.

Paraoksonaz 3 tane sistein molekülü içerir, bunlardan 41 ve 352. pozisyondaki sisteinler molekül içi disülfid bağının oluşumuna katılırken, 283. pozisyondaki sistein molekülü ise serbest halde bulunur ve enzimin aktif merkezinin anahtar bileşenidir. 283. pozisyondaki sisteinin, LDL'yi oksidasyondan korumada önemli bir fonksiyona sahip olmasına karşın organofosfatların hidrolizinde bir etkisi gözlenmemektedir. Paraoksonazın sistein aminoasitlerinin serbest olduğu ve disülfid bağı oluşturduğu iki yapısal izoformu mevcuttur. Bu izoformlar PON1'in iki oksidasyon durumunu oluşturur. Paraoksonazın yapısında bulunan N-terminal hidrofobik sinyal peptidi, HDL ile etkileşim için gerekmektedir. PON proteinlerinin aminoasit dizileri şekil 2.4'de gösterilmiştir.

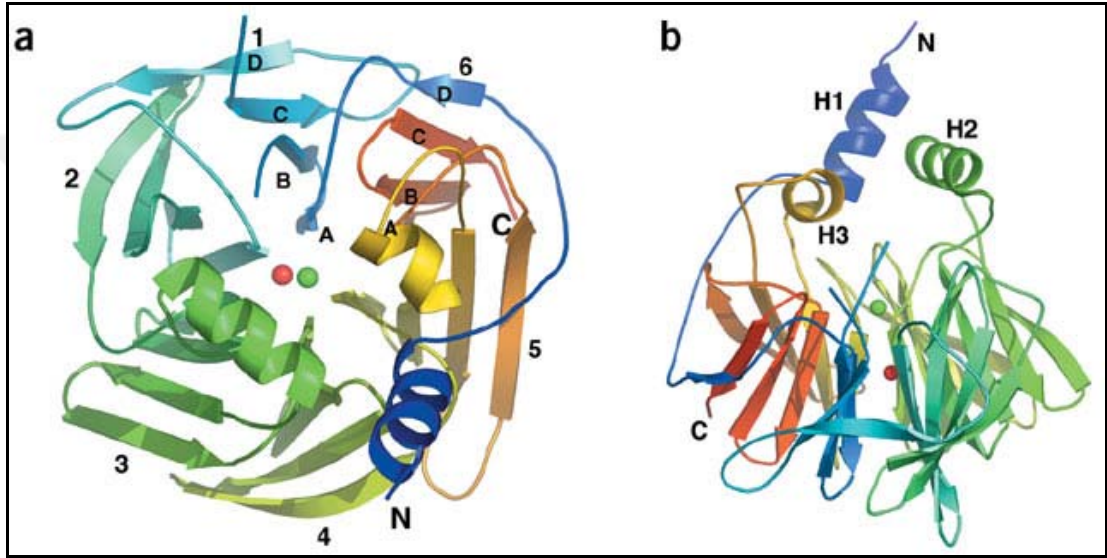


Şekil 2.4. İnsan PON proteinlerinin aminoasit dizileri ve karşılaştırılması. (H öneki insan, C öneki C. Elegans ve G2E6 kısaltması rekombinan PON için kullanılmıştır) (19).

PON1 aktivitesi sülfhidril bileşikler tarafından inhibe edilmektedir ve bu inhibisyon sistein ile geri dönebilir. Bu nedenle sistein kalıntıları aktif bölgenin önemli bir bileşenidir. Buna rağmen 283. pozisyonundaki sistein paraoksonun hidrolizi için gerekli değildir. Sistein türevleri PON1'i inhibe etmesine rağmen içerdiği -SH grubu enzimin üç boyutlu yapısına katılarak aktif bölgenin oluşmasında rol alır. PON1'in diğer hidrolazlarda bulunan katalitik aminoasit triadını içerip içermediği tam olarak bilinmemektedir.

Enzim aktivitesi kalsiyuma bağımlıdır. Üç boyutlu yapıda β -tabakaların merkezinde 7.4 Å aralıklı iki adet kalsiyum iyonu bulunmaktadır (19). Bunlardan bir tanesi yapısal kalsiyum olup yapıdan uzaklaştırılması, tersinmez denatürasyona neden olmaktadır. Diğer ise katalitik etkinlikte görev alan kalsiyumdur (Şekil 2.5). Kalsiyum iyonlarının katalitik mekanizmada iki önemli rolü vardır. Ca^{+2} katalitik reaksiyona direk olarak katılarak veya aktif bölgenin uygun konformasyonel yapı kazanmasını

sağlayarak etki eder. Ayrıca, Ca^{+2} paraoksonun P-O bağıını polarize ederek fosforun nükleofilik saldırıya yatkınlığını sağlar, böylece dietil fosfat'ı aktif bölgeden uzaklaştırır (37,38). PON1'in kalsiyum iyonuna olan bu ihtiyacından dolayı enzim aktivitesi çalışmalarında EDTA içeren plazma kullanılmamalıdır. PON1'in organofosfat substratlarına karşı hidrolitik aktivitesi kalsiyuma bağımlı iken, lipid peroksitlerin birikimini önlemede kalsiyumun gerekli olmadığı bildirilmektedir (37).

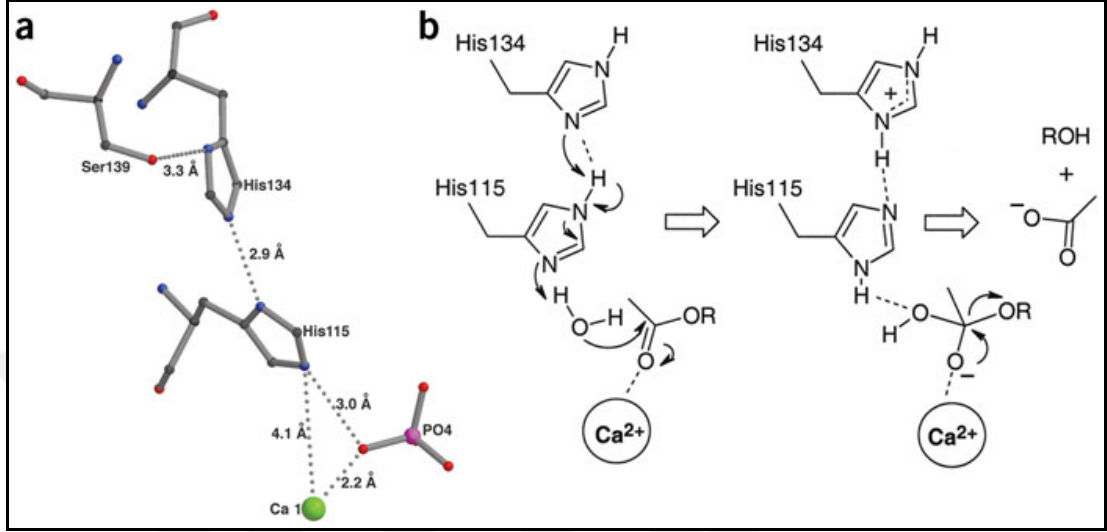


Şekil 2.5. PON1 proteininin üç boyutlu genel yapısı (19).

(a) Üç boyutlu yapının üstten görünümü. Merkezde yeşil (Ca1) ve kırmızı (Ca2) olarak gösterilen 2 kalsiyum atomu bulunmaktadır. (b) Üç boyutlu yapının yandan görünümü. H1-3 üst kısımda yer alan üçlü helikal katlantıdır.

Saflaştırılmış insan PON1'in pH 10.5'da paraoksonu hidrolize etmesi üzerine yapılan kinetik çalışmalarda paraoksonun substratına bağlanmasını takiben hızlı bir aktivite patlaması oluşur ve son olarak da p-nitrofenol açığa çıkar. İnsan serumunda tek gen ürünü olan paraoksonaz enzimi hem arilesteraz hem de paraoksonaz aktivitesi içerir. Aktif bölgelerinin benzerliği açık olmasa da kompetitif olmaları aynı aktif merkezin özelliklerinin paylaşıldığını gösterir. PON1'in fizyolojik substratları henüz tanımlanmamıştır; fakat insektisit ve sinir gazı yapımında yaygın olarak

kullanılan organofosfat bileşiklerinin hidrolizini katalizlemekte ve bu nedenle in vivo ksenobiyotik metabolizması ve toksikolojik çalışmalar için büyük önem taşımaktadır.



Şekil 2.6. PON1'in katalitik bölgesi ve etki mekanizması.

(a) Katalitik bölgenin alt kısmında Ca1 atomu ve fosfat iyonu yer alır. (b) PON1'in fenil ve 2-naftilasetat gibi ester substratlar üzerindeki etki mekanizmasının şematik gösterimi. İlk olarak His-His bağında su molekülünün deprotonasyonu ile hidroksid anyonu oluşur ve bu anyon ester karbonile bağlanarak oksianyonik tetrahedral ara bileşiği oluşturur. İkinci basamakta bu ara bileşik yıkıma uğrayarak bir asetat iyonu, fenol veya 2-naftol oluşturur.

2.5.2. PON2

PON2 44 kDa molekül ağırlığında intraselüler bir proteindir (39,40). PON2'nin de PON1'e benzer şekilde bazı hastalıklarla birliktelik gösteren polimorfizmleri mevcuttur. Populasyon çalışmalarında 148. pozisyondaki alanin veya glisin (A/G148), 311. pozisyonda ise sistein veya serin (C/S311) yer değişimi gösterilmiştir. A/G148 polimorfizmi total ve LDL kolesterol, açlık glukoz düzeyleri ve doğum ağırlığında değişimler ile birliktelik gösterir. C/S311 polimorfizmi ise koroner arter hastalığı, tip 2 diabetli hastalarda

iskemik inme, Alzheimer hastalığı ve postmenopozal kadınlarda azalmış kemik dansitesi ile birlikte görülmektedir (41-49).

PON2'nin vücutta antioksidan etkisi bulunmaktadır. PON2'yi aşırı derecede eksprese eden hücrelerde hidrojen peroksit maruz kalma sonucu hücre içinde oldukça düşük oranda oksidatif stres saptanmıştır. Ayrıca PON2 okside olmuş LDL'nin daha fazla okside olmasını engellemektedir. Bu nedenle PON2 hücreleri oksidan hasardan koruyan hücresel bir antioksidandır. Buna rağmen bu etkisini hangi mekanizma ile gösterdiği tam olarak açıklanamamıştır.

PON2 oksidatif strese yanıt olarak salınır. Hiperkolesterolemisi bulunan bireylerin makrofajlarında normal kolesterol düzeyleri olan kişilere oranla rölatif olarak daha düşük PON2 sentezi olduğu görülmüştür. Bu kişilerde atorvastatin kullanımı sonrası bu durumun tersine döndüğü gözlenmiştir (50). PON2 salınımindaki asıl sorumlu faktörler henüz tespit edilememiştir.

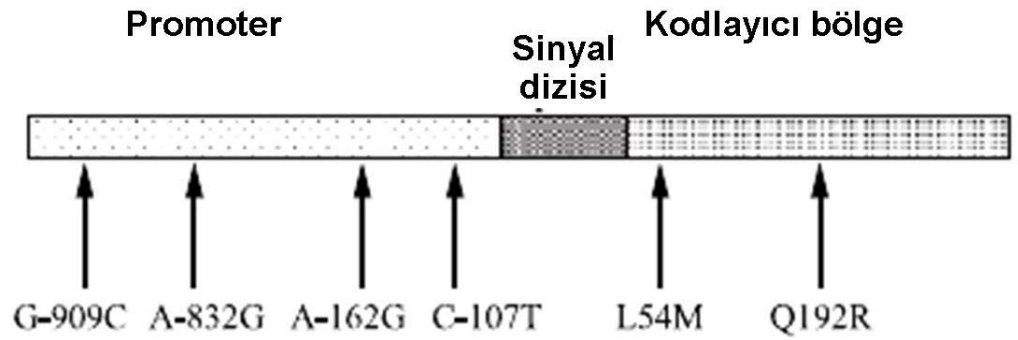
2.5.3. PON3

PON3 karaciğerde sentezlenen ve dolaşımda HDL ile birlikte bulunan ve molekül ağırlığı 40 kDa olan bir proteindir. Serum düzeyleri PON1'e oranla oldukça düşüktür (38,51). Mevcut üç PON proteini arasında en yeni ve özellikleri en az bilinenidir. PON1 ve PON2'nin aksine bugüne kadar herhangi bir polimorfizmi saptanamamıştır. PON1 ve PON2 gibi antioksidan özelliklere sahiptir. Draganov ve ark. yaptığı çalışmada tavşan serumundan saflaştırılan PON3'ün in vitro olarak bakır tarafından uyarılan LDL oksidasyonunu inhibe ettiğini göstermişlerdir. Aynı çalışmada PON3'ün LDL'yi oksidasyona karşı korumada PON1'e oranla 100 kat daha güçlü olduğu gösterilmiştir. PON3'de PON1 ve PON2 gibi okside LDL'nin biyolojik etkilerini geriletmektedir. PON1 knock-out (KO) farelerde az miktarda da olsa PON3 bulunmasına rağmen HDL'nin antioksidan etkileri görülmemektedir. Sonuç olarak PON3'ün HDL'nin oldukça küçük bir bileşeni olduğu ve HDL'nin antioksidan etkisine tek başına çok az katkısı olduğu ortaya konmuştur (52,53).

PON1 ve PON2'nin aksine PON3 ekspresyonu oksidatif strese yanıt vermez. PON3 ekspresyonu oksidatif stresi uyaran ajanlara maruz bırakılan makrofajlarda değişmezken PON3 laktonaz aktivitesi azalmaktadır.

2.6. PON1 Sentezi

PON1 başlıca karaciğerde sentezlenir ve seruma salınır. Serum PON1 düzeyini belirleyen en önemli faktör karaciğerden salınımıdır. İnsanlar arasında serum PON1 konsantrasyonu ve enzim aktivitesi farklılıklar gösterebilmektedir. Bu farklılıklar enzim aktivitesi ve protein konsantrasyonunu belirleyen PON1 geninin promotor ve kodlayıcı bölgelerindeki bazı polimorfizmlerden kaynaklanmaktadır. (16,23,24,54,55).



Etkileri

Konsantrasyon	-	-	+++	+	-
Aktivite	-	-	-	-	+++

Şekil 2.7. Promotor ve kodlayıcı bölgelerdeki polimorfizmler ve bunların konsantrasyon ve aktivite üzerine etkileri.

Başlıca kodlayıcı bölge polimorfizmi olan Q192R fizyolojik olmayan substratlar üzerinden etkisi gösteren aktivite polimorfizmidir. Aktivite polimorfizmi değişkendir. Q veya R alelinin yüksek veya düşük enzim aktivitesine sahip olacağını substrat belirler. Bu tür aktivite polimorfizmleri okside substratlarla görülmemektedir. PON1 geninin kodlayıcı olmayan bölgesindeki polimorfizmler gen ekspresyonu ve enzimin serum düzeylerini etkilemektedir. Ayrıca 107. pozisyonundaki polimorfizmin serum PON1

konsantrasyonu ve aktivitesi üzerinde belirgin bir etkisi bulunmaktadır (16,25). Bu çalışmalar -107 polimorfizmi ile tanıma dizisi ortadan kaldırılan transkripsiyon faktör Sp1 ve sterol duyarlı transkripsiyon faktör olan sterol regulatory element binding protein-2 (SREBP-2)'nin önemini göstermektedir (27). Buradan yola çıkarak hepatositin kolesterol homeostazisinin PON1 sentezi üzerinde etkisi olduğu düşünülmektedir. PON1 sentezi aynı zamanda inflamatuvar durumlara da oldukça duyarlıdır. Bu nedenle PON1 serum konsantrasyonu ve hepatik sentezi infeksiyöz durumlarda azalan bir negatif akut faz reaktanı olarak tanımlanabilir (56-58).

2.7. PON1 Salınımı ve Hücre Membranlarıyla Etkileşimi

Karaciğerden salınan PON1 serumda başlıca HDL tarafından taşınır. PON1 salınım mekanizması oldukça önemlidir. Çünkü hücrelerden salınımını etkileyen faktörler serum enzim seviyelerini belirler.

Sinyal peptid dizileri peptidlerin sekretuar yollara yönlendirilmesinde ve membranlara yerleştirilmesinde önemli bir role sahiptir (59,60). Bu da hücrelerden salınım açısından PON ailesinin üyeleri arasındaki farklılıkları açıklamaktadır. Büyük oranda homoloji (%60) bulunmasına rağmen PON1 ve PON3'ün aksine PON2 hücreden salınmaz (40,51,61). Sinyal dizilerinin tespiti için yapılan N-terminal bölge analizleri PON1 ve PON3'ün aksine PON2 için bu tür sinyal peptidlerinin bulunmadığını göstermektedir. Bu nedenle PON2 sekretuar bir peptid değildir.

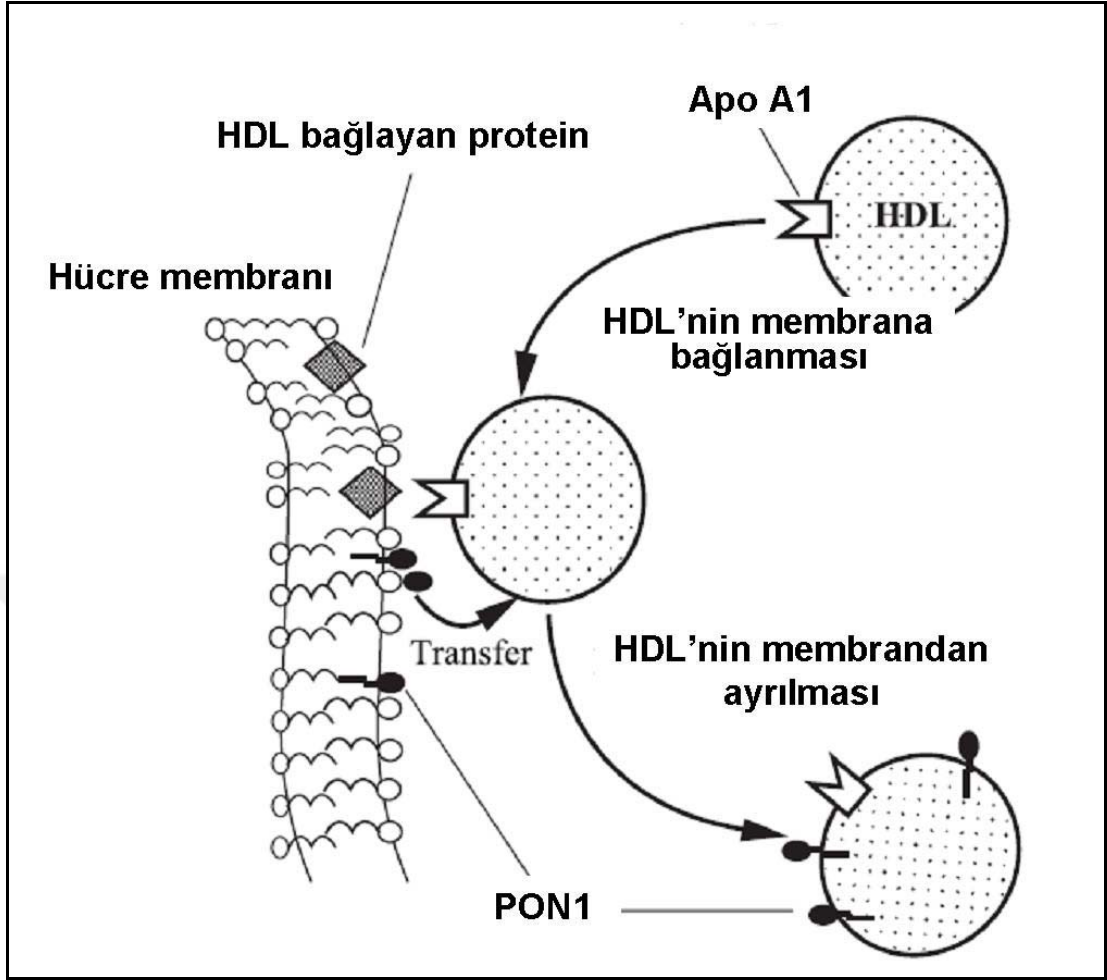
PON1 hücre membranından salınım için uygun bir alıcıya ihtiyaç duyar. Bunun için en uygun alıcıların fosfolipid içeren lipid bileşikler olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (tablo 2.2) (61). Fosfolipidler tek başlarına PON1 salınımını uyaramamaktadır. CHO (Chinese-hamster ovary) hücre kültürü kullanılan bir çalışmada ortamda lipoprotein bulunmadığında PON1 salınımının azaldığı görülmüştür. Ortama fosfolipid miçellerin veya LDL eklenmesi ile PON1 salınımı olmamıştır. HDL optimal bir uyaran olmasına rağmen LDL'nin yeterince salınımı uyaramaması salınımda başka faktörlerin de etkili olduğunu göstermektedir. Salınım doygunluk gerektiren yüksek afiniteli bir süreçtir.

Tablo 2.2. Lipid bileşikleri ve apolipoproteinlerin PON1 salınımına etkisi

Lipid bileşikleri	Salınımında % artış	24 s sonra aktivite kaybı (%)
HDL (Native)	87.0	2.5
HDL (Apo AI)	172.8	3.7
HDL (Apo AII)	209.7	5.3
Fosfolipid vezikülleri	55.0	25.7
LDL	0.4	67.0
Lipidden fakir Apo AI	21.4	44.5
BSA	3.2	63.0

PON1'in hücre dışına salınıp HDL'ye bağlanması dezorpsiyon mekanizması ile olur. Önce PON1 hücre membranının dış yüzeyine çıkar ve buradan HDL'ye transfer olur (şekil 2.8). Bu transfer işlemi sırasında HDL önce hücre membranında yer alan scavenger reseptör B1'e (SR-B1) bağlanır. Karaciğerde sentezlenen bu reseptör HDL'ye yüksek oranda seçicilik gösterir (62,63). HDL'ye bağlı PON1 salınımı konsantrasyon bağımlı ve doyurulabilir olması salınımın bu reseptör aracılığıyla olabileceği hipotezini güçlendirmektedir (61). SR-B1 HDL'nin hücre yüzeyi ile etkileşimini artırır. Bu reseptörün serbest ligand spesifitesi bulunmaktadır ve apoAI ve apoAII içeren HDL'ye bağlanabildiği gibi fosfolipid miçellerine de bağlanabilir (63). Lipidden fakir apoAI'e bağlanamaması ise oldukça ilginçtir. SR-B1 HDL'yi hücre membranına yakın tutarak membrandan HDL'ye PON1 transferini gerçekleştirir. SR-B1 reseptörünü aşırı eksprese eden hücrelerden PON1 salınımının arttığı görülmüştür.

PON1 fosfolipidlerin varlığında HDL'den yarışmalı olarak uzaklaştırılır. Bu sayede PON1 HDL'den hücre membranları ve lipid hasarının olduğu fosfolipidden zengin bölgelere taşınabilir. Immunofloresan çalışmalarda PON1'in lipid hasarı oluşturulmuş CHO ve Huh-7 hepatosit hücre membranlarının dış yüzeyinde olduğu görülmüştür (61). Membrana bağlı PON1 fenilasetat tarafından aktive olur. HDL varlığında bu aktivite kaybolur (61). Sonuç olarak HDL PON1'i hücre membranlarından uzaklaştırabilir.



Şekil 2.8. PON1'in hücreden HDL'ye bağlanarak salınımı.

2.8. PON1 Stabilitesi

Daha öncede bahsedildiği gibi lipidden fakir apoA1, hücrelerden PON1 salınımını uyarmaz. Apo A1 salınan PON1 proteinin stabilitesi için oldukça önemlidir (61,64). Apo A1 eksikliği sendromlarında yapılan çalışmalarda, apo A1'in bu etkisini destekleyici şekilde, serum PON1 seviyesi azalmaktadır (65). Fosfolipid vezikülleri PON1 salınımını uyarmasına rağmen PON1-fosfolipid kompleksinin enzim aktivitesi çok çabuk kaybolur. Aksine apo A1'in fosfolipid ile oluşturduğu komplekste böyle bir aktivite kaybı görülmez (Tablo 2.2) (61). PON1 salınımının uyarılması ve enzim stabilitesinin artırılması için apo A1 ve apo A1 yer değiştirebilirler (Tablo 2.2) (61). Apo A1 sadece enzimin stabilitesini sağlamakla kalmaz aynı zamanda enzimin spesifik aktivitesini de artırarak daha aktif bir molekül haline gelmesini sağlar (61,66).

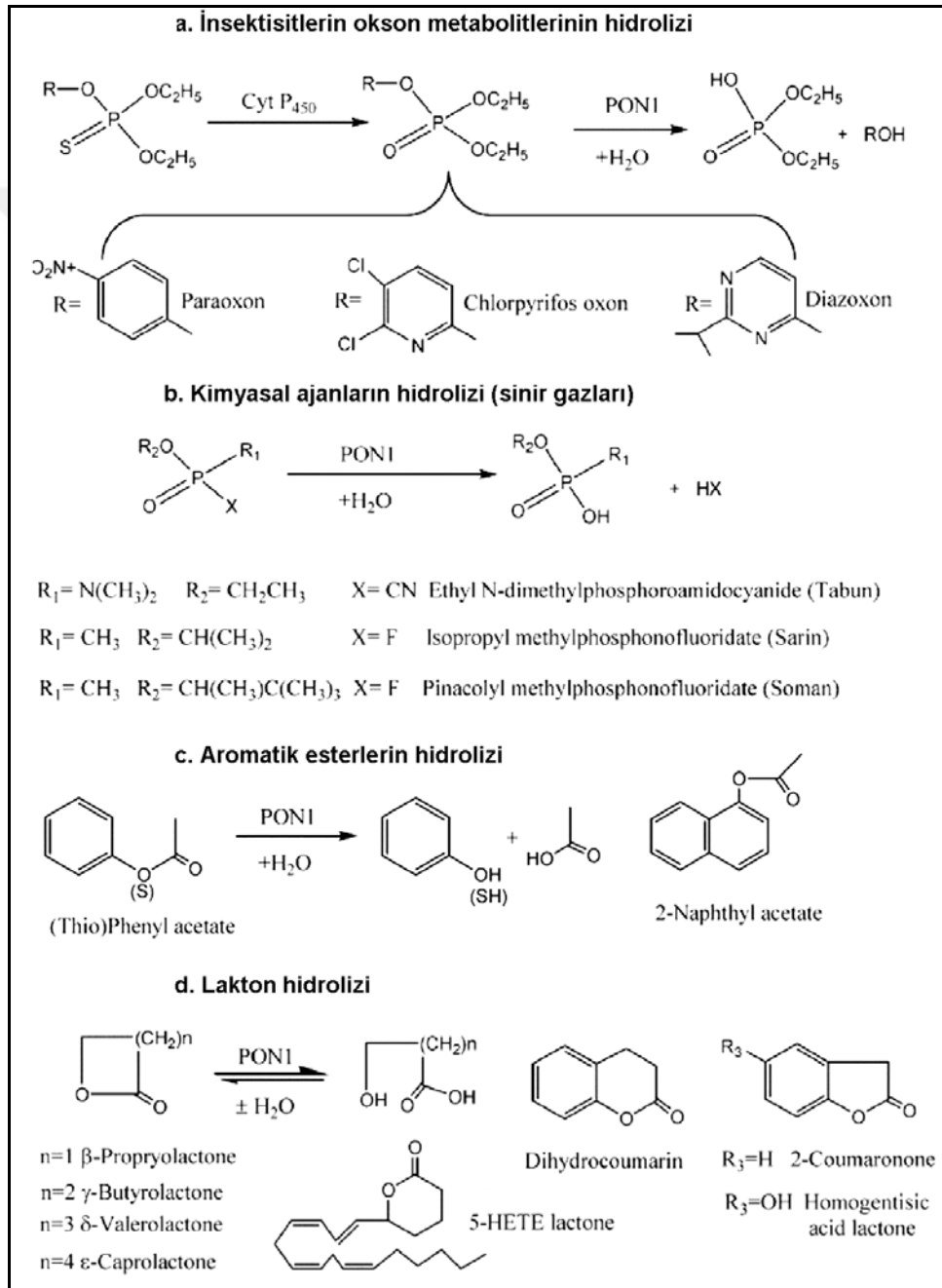
Apo AII'nin enzim stabilitesindeki rolleri açıklanmasına rağmen apo AII'nin stabilite üzerine etkileri hala tam olarak ortaya konamamıştır. Yapılan çalışmalarda HDL üzerinde apo AII'nin bulunması PON1 salınımı ve stabilitesini artırmaktadır (61). Buna rağmen apo AII'nin aşırı üretildiği transgenik farelerde PON1 aktivitesinde belirgin bir düşüş olmaktadır. Ayrıca HDL'nin LDL'yi oksidasyondan koruma yeteneğinde de belirgin bir azalma meydana gelmektedir. Apo AII'nin HDL'nin PON1 içeriğini nasıl yok ettiği tam olarak bilinmemesine rağmen apo AII'nin HDL'nin hidrofobik bölümlerine yarışmalı olarak bağlanarak PON1'in HDL'ye bağlanmasını engellediği düşünülmektedir.

2.9. PON1'in Biyokimyasal Fonksiyonları

PON1'in bilinen başlıca iki fonksiyonu bulunmaktadır. İnsektisit olan paraokson gibi organofosforlu bileşikler detoksifiye etmek ve antioksidan etkisi ile LDL'yi oksidan hasardan korumaktır (67). Son yıllarda PON1'in ayrıca laktonaz aktivitesi ile siklik karbonat esterleri ve farmakolojik ajanları da hidroliz ettiği gösterilmiştir (38).

PON1'in ilk olarak tanımlanan fonksiyonu, organofosfat nörotoksinleri, aromatik karboksilik asit esterlerini ve insektisidleri hidroliz etme yeteneğidir (9). PON1 parathion, diazinon ve klorpirifos gibi insektisitlerin toksik okson metabolitlerini (68) ve sarin ve soman gibi sinir ajanlarını hidrolize edebilmektedir (Şekil 2.9-a,b) (69,70). PON1 enziminin kan, karaciğer ve diğer bazı dokularda bulunması sayesinde düşük düzeydeki organofosfatlara uzun dönem maruz kalanlarda koruma sağlamaktadır. PON1 diğer B esterazlar gibi stoikometrik olarak substrata bağlanmak yerine katalitik olarak etki eder. Buna rağmen PON1'in birçok organofosfata karşı katalitik etkinliği oldukça düşüktür. Bu nedenle akut olarak organofosfatlara maruz kalanlarda sınırlı bir koruma sağlar. Örneğin PON1 eksikliği bulunan fareler ile vahşi tip farelere paraokson verilmesi sonucunda aynı oranda toksisite olduğu gözlenmiştir (2). Buna rağmen PON1 diazokson ve klorpirifos gibi diğer organofosfatlara karşı 10-20 kat daha yüksek katalitik etkinliğe sahiptir.

PON1'in aromatik ester substratları fenilasetat, tiofenilasetat ve 2-naftil asetattır (Şekil 2.9c) (68). Siklik karbonatlar (örneğin; homogentisik asit lakton, dihidrokumarin, γ -butirolakton ve homosistein tiolakton) gibi bazı aromatik ve alifatik laktonlar da PON1 tarafından hidrolize edilmektedir (Şekil 2.9d) (71,72). PON1 aynı zamanda γ - ve δ -hidroksikarboksilik asidin ters reaksiyonu olan laktonizasyonu da katalize eder (73).



Şekil 2.9. PON1'in enzimatik aktiviteleri ve substratları (74).

PON1'in ikinci ve en önemli biyolojik fonksiyonu antioksidan etkiye sahip olmasıdır. Serum PON1 serumda HDL ile birlikte bulunur ve lipoproteinlerin oksidasyonunu önlemede rolü bulunmaktadır. HDL ile ilişkili enzimler olan PON1, lesitin kolesterol acil transferaz (LCAT) ve Platelet Aktive Edici Faktör Asetil Hidrolaz'ın (PAFAH) oksidatif hasara karşı lipoproteinleri koruduğu gösterilmiştir (36,75,76). HDL ile ilişkili enzimler tablo 2.3'de gösterilmiştir.

Tablo 2.3. HDL ile ilişkili enzimler

PON1
LCAT
PAFAH
Proteinaz (Elastaz benzeri)
Fosfolipaz D
Albumin
Apo AI

PAFAH hem proinflamatuvar bir molekül olan platelet aktive edici faktörü (PAF) hem de oksitlenmiş fosfolipidleri hidroliz etme özelliği ile koruyucu etkide önemli rolü olduğu düşünülen bir moleküldür. Ancak PAFAH insanda, HDL'den çok LDL üzerinde bulunan bir enzimdir (7). HDL'ye özgü olan ve lipid peroksitleri hidroliz etmede güçlü etkisi olduğu bildirilen enzim ise PON1'dir (78). Sonuç olarak HDL üzerindeki Platelet aktive edici faktör'ün hidrolizi PON1 tarafından gerçekleştirilmektedir (33). PON1 hidrolizle PAF'ın Sn-2 pozisyonundan asetat salınmasını sağlar. PAFAH LDL'nin oksidasyonunda Apo-B100 modifikasyonunu ve konjuge dien oluşumunu inhibe eder, ancak tiyobarbitürik asit ile reaksiyona giren maddelerin (TBARS) oluşumu üzerine etkisi yoktur. PON1 ise hem lipid peroksit oluşumu hem de TBARS üretimini inhibe etmektedir. HDL, PON1 aktivitesine sahip değilse LCAT ve PAFAH'ın lipid peroksidasyonuna karşı insan LDL'sini koruyamayacağı gösterilmiştir (79).

PON1 aktivitesi paraoksonaz aktivitesi ile sinonim olarak kullanılmasına rağmen PON1'in arilesteraz, laktonaz, düşük seviyede peroksidaz ve fosfolipaz A2 benzeri enzimatik aktivitelere de sahip olduğu son dönemlerde yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (73,80-83). PON1 enzimi bulunmayan fareler ateroskleroza karşı yatkın hale gelirler. Paraoksonaz LDL kolesterolü, bakır iyonu ve serbest radikallerin indüklediği oksidasyondan korumaktadır (84-87). PON1 lipid hidroperoksitleri ve okside fosfolipidleri hidrolize edip lipid peroksitlerin hem HDL'de hem de LDL'de birikimini önler böylece antiaterojenik etkisi ortaya çıkar. Bu özelliği nedeniyle, HDL'nin LDL'yi oksidasyona karşı koruyucu etkisinden PON1 sorumludur (11,88). PON1'in TBARS düzeylerini ve lipoperoksit oluşumunu da önlediği gösterilmiştir (11). Paraoksonaz lipid peroksitlerin aterojenik etkilerini yok ederek hücre membranlarını koruyucu etki gösterir.

PON1 LDL'yi bakır veya hücre aracılı oksidasyondan korumaktadır (51,89). PON1'in bu etkisinin mekanizması tam olarak bilinmemesine rağmen 284. pozisyonundaki serbest sistein aminoasiti diğer enzimatik aktivitelere bağımsız olarak PON1'in antioksidan etkisinde önemli bir rol oynamaktadır (90). Aviram ve ark. PON1 sistein 284 mutant hücrelerin LDL oksidasyonundan korunamadığını göstermiştir (90). Serbest sistein içeren proteinler antioksidan özelliklerini genellikle içerdikleri sülfhidril gruplarının metal ve radikalleri ortamdaki uzaklaştırması ile gösterirler. Buna rağmen PON1'in kristal yapısına bakıldığında sistein aminoasitinin molekülün içinde gömülü olduğu ve bu etkiyi göstermekten uzak olduğu gösterilmiştir (19). Harel ve ark. sistein aminoasitinin protein yapısının stabilitesinde önemli bir rol oynadığını ve PON1 sistein 284 mutantlarında PON1 protein ekspresyonu ve stabilitesinin oldukça zayıf olduğunu göstermiştir (19).

LDL oksidasyonu sırasında meydana gelen okside fosfolipidler, okside kolesterol esterleri, lizofosfatidilkolinler PON1'deki 284. pozisyonundaki sistein aminoasitindeki serbest sülfhidril grubu ile etkileşime girer ve enzimin inaktive olmasına yol açarlar (51). PON1'in arilesteraz aktivitesinin, LDL oksidasyonu sırasında yaklaşık %50 oranında azaldığı gösterilmiştir. LDL'yi oksidasyona

karşı koruyan paraoksonaz enzimi okside LDL oluşumu esnasında zamanla inaktive olmaktadır.

Marathe ve ark. nın yaptığı çalışmada (91) okside fosfolipidlerin HDL tarafından yıkımında etkili olan faktörün PON1 değil PAFAH olduğu iddia edilmiştir. Bunu destekleyen iki deneysel bulgu mevcuttur. İlkinde okside fosfolipidlerin PON1 tarafından hidrolizi için kalsiyum iyonuna ihtiyaç yoktur. PON1 ise organofosfatları hidrolize ederken kalsiyuma son derece ihtiyaç duyar. Buna rağmen PON1'in lipid peroksitleri hidrolize ederken kalsiyuma ihtiyaç duymadığını gösteren birçok çalışma vardır (90,92). İkinci bulgu da saflaştırılmış PON1'in okside fosfolipidleri hidrolize edememesidir. Fakat bu çalışmayı yapan yazarlar çalışma öncesi PON1 üzerindeki lipidleri uzaklaştırmışlardır. PON1'in katalitik aktivitesi için hidrofobik bir ortama ihtiyaç duyduğu çok iyi bilinmektedir (64). Bu çalışmada olduğu gibi saflaştırılmış PON1'den lipid ortamın uzaklaştırılması PON1 aktivitesinin kaybına neden olur. Daha öncede bahsedildiği gibi HDL'den izole edilen PON1 PAF'ı hidrolize etmektedir (82). Bu çalışmada PAFAH'ın etkisini engellemek için PAFAH ile kontamine olmamış saf PON1 kullanılmıştır. Ayrıca ortama güçlü insan plazma PAFAH inhibitörleri eklenmesine rağmen PAF'ın PON1 tarafından hidrolize edilmesi etkilenmemiştir. Sonuç olarak HDL üzerindeki PON1 lipid peroksitlerin yanında PAF'ı da hidrolize etmektedir.

HDL lipid peroksitlerin serumdaki en önemli taşıyıcısıdır. Oksidatif stres altında, HDL de oksidasyona maruz kalmaktadır. HDL'nin oksidatif hasara uğraması; ters kolesterol taşıma fonksiyonunun bozulmasına yol açar. PON1, HDL'yi de oksidasyondan koruyarak HDL'nin ters kolesterol taşıma fonksiyonunun devamını sağlar. Sonuç olarak PON1 makrofajlarda kolesterol birikimini engelleyerek köpük hücre oluşumunu ve ateroskleroz gelişimini yavaşlatmaktadır (80,89,93).

Hayvan çalışmalarında intravenöz olarak bakteriyel endotoksin verilmesi sonucunda paraoksonaz aktivitesinin arttığı görülmüştür. PON1'in endotoksinlerin yapısında bulunan lipopolisakkaridleri (LPS) hidrolize ettiği gösterilmiştir (94). Farelere 50 mikrogram Salmonella LPS enjekte edilmesi

sonrasında 6 saat içinde HDL ve PON1 seviyelerinde artış görülmüştür. LPS verilmesi aynı zamanda haptoglobulin seviyelerini de yükseltmiştir. Bu bulgulara rağmen endotoksemili hastalarda HDL düzeylerinin düştüğü bilinmektedir (95).

2.10. PON1 ve HDL

2.10.1. HDL'nin Antioksidan Rolü

Serum HDL ile ateroskleroz arasındaki ters ilişkinin tek bir açıklaması yoktur. Uzun zamandır bu ilişki bilinmekle birlikte dikkatler, HDL'nin ters kolesterol taşınması için hız sınırlayıcı bir basamak olabileceği konsepti üzerinde odaklanmıştır. Bununla birlikte bu görüşü destekleyen kanıtlar tamamlanmamış durumdadır. Çok sayıda insan apo AI gen kopyasını eksprese eden veya insan apo AI infüzyonları yapılan tavşanlar deneysel diyetle uyarılmış ateroskleroza karşı korunabilmiş olmakla birlikte, bunu başarmak için gerekli olan dolaşımdaki apo AI seviyeleri, insanlarda görülen varyasyonların oldukça üzerindedir. Sadece 2 insan apo AI gen kopyasını eksprese eden (aslında bu genler bile HDL kolesterol konsantrasyonlarını bu hayvanlarda 2 misline çıkarmış olmalarına rağmen) tavşanlar ateroskleroza karşı yeterince korunamamaktadır. İlave olarak apo AI knock-out farelerin ateroskleroza duyarlı hale gelmedikleri görülmüştür. Tangier hastalığının (analfalipoproteinemi) nedenleri ile ilgili son yıllarda yapılan çalışmalarda ters kolesterol transportundaki belirgin defektin bu hastalıkla ilişkisi olmadığı ve sorunun dolaşımdaki düşük HDL seviyelerinden kaynaklandığı ortaya konmuştur.

2.10.2. PON1'in HDL ile Olan İlişkisi

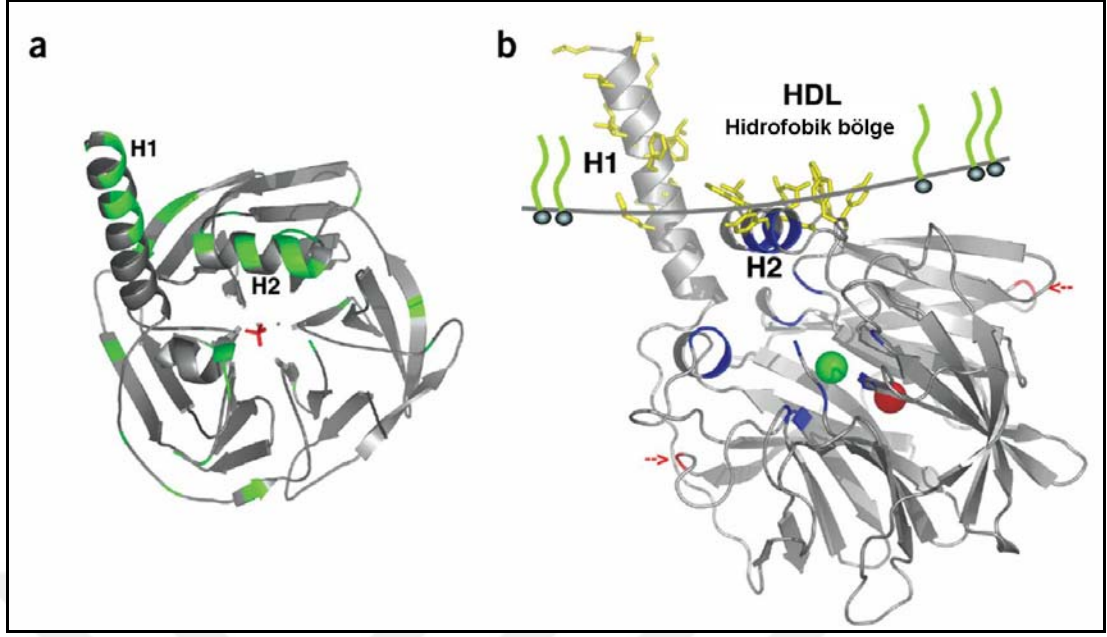
Apolipoprotein AI, HDL'nin en önemli yapısal proteinlerinden biridir. PON1'in büyük bir kısmı apo AI içeren HDL ile taşınır. Apo J veya klusterin ile birliktelik gösteren HDL'nin bir alt tipi de PON1 taşımaktadır (96,97). PON1, HDL üzerinde yer alan apo AI'e bağlanır. PON1 gen promotor polimorfizmleri serum PON1 konsantrasyonundaki değişimlerin yaklaşık %25'nden sorumlu iken kalan %75'lik kısım diğer faktörlerin etkisi ile

oluşmaktadır. HDL, PON1'i serumda taşıyan moleküldür ve enzim konsantrasyonunun önemli bir belirleyicisidir. HDL eksikliği sendromlarında PON1 seviyelerinin azalması da bunu kanıtlamaktadır (65). Yapılan çalışmalarda PON1'in HDL'nin trigliseridden zengin olan HDL2 tipinde bulunduğu gösterilmiştir (97). Total PON1'in yaklaşık %30'u apoJ'ye bağlı taşınır. PON1 in vivo ve in vitro ortamlarda büyük HDL tiplerine bağlanma eğilimi gösterir ki bu da HDL boyutunun küçüldüğü diyabet gibi hastalıklarda salınımını etkilemektedir (97).

2.10.3. PON1'in HDL'ye Bağlanma Mekanizması

PON1 hücreden salındıktan sonra N-terminal hidrofobik sinyal dizisi üzerinde kalır (60). Sinyal dizisi uzaklaştırılmış N-terminal PON1 mutantının HDL'ye bağlanamadığı görülmüştür (64). Bu çalışmalar sonucunda PON1'in HDL'ye N-terminal hidrofobik sinyal dizisi üzerinden bağlandığı gösterilmiştir. PON1'in üç boyutlu kristal yapısı ortaya konduktan sonra HDL ile olan ilişkisi daha iyi açıklanmıştır. N-terminal sinyal dizisinin sekonder yapısı bütün bölgenin transmembran heliks yapısı ile uyumlu olduğu gösterilmiştir. N-terminalin çoğu tersiyer yapıda görünmezken hidrofilik kısmı heliks oluşturur. N-terminal helikse bitişik olan ikinci heliksin hidrofobik kalıntısı sıvı ortama yönlendirilmiştir. Bu bölgeler PON1'in membranlara ve lipoproteinlere bağlanmasını sağlayan hidrofobik bölgeleri oluşturur. HDL'ye bağlanma bölgesi membran bağlayan proteinler olarak bilinen triptofan ve tirozinden (aromatik kuşak) zengindir (Şekil 2.10) (19).

N-terminal PON1 mutantları vahşi tipten daha düşük K_m ve V_{max} 'a sahip olmaları nedeniyle lipofilik substratlara daha düşük afinite gösterirler (64). PON1 substratları genellikle hidrofobik yapıdadır. Bu nedenle PON1'in enzimatik aktivitesi için HDL veya fosfolipidlere bağlanması oldukça önemlidir. Üç boyutlu yapısından da anlaşılacağı gibi PON1'in HDL'ye bağlanması ile aktif bölgesi modifiye olur. Çünkü HDL'ye tutunma bölgesi aktif bölgenin içinde yer alır.



Şekil 2.10. PON1'in HDL yüzeyine bağlanması.

(a) PON1'in üç boyutlu yapısı ve hidrofobik yüzeyleri. N terminal kalıntıları H1'de yer almaktadır. Yeşil olarak gösterilen bölgeler hidrofobik kalıntılardır (lösin, fenilalanin, prolin, izolösin, tirozin, triptofan ve valin) ve $>20 \text{ Å}^2$ den büyük bir alan oluştururlar. (b) Sarı olarak gösterilen hidrofobik kalıntılar HDL'ye bağlanmada görev alır. Tyr185, Phe186, Tyr190, Trp194, Trp202 (heliks H2) ve Lys21 (heliks H1) yan zincirleri HDL'nin hidrofobik bölgesinin iç kısmına bağlanan bölgelerdir. H1'in lösin ve fenilalanin hidrofobik yan zincirleri apolar bölgede yer alır. Aktif bölge ve selektiviteyi sağlayan kalıntılar mavi renk ile ve glikozilasyon bölgeleri (Asn253 ve Asn324) kırmızı renk ile gösterilmiştir.

2.11. PON1 ve LDL

2.11.1. PON1'in LDL ile ilişkisi

PON1 serumda HDL ile taşınmaktadır. LDL ile kompleks oluşturamazlar (44). In vitro ortamda PON1 apoA1, apoAII veya apoE içeren HDL ve protein içermeyen serbest fosfolipid miçelleri ile birlikte (61,64,66). Bu nedenle ApoA1 fosfolipid içeren veziküllerde taşınım için gerekli değildir. Bu da HDL eksikliği sendromlarında PON1 varlığını açıklamaktadır (64,65). ApoA1 knockout farelerdeki serum PON1 aktivitesi vahşi tiplere oranla daha

az stabildir (65). In vitro çalışmalarda PON1 aktivitesinin fosfolipid miçellerle kompleks oluşturduğunda protein içeren veziküllerle kompleks oluşturmaya oranla daha hızlı aktivitesini kaybettiği gösterilmiştir. PON1'in apoA1 varlığında fosfolipidlere bağlanması sonucunda aktivitesi artmaktadır (61,64,66).

PON1'in lipoproteinlere bağlanması için apoA1'e ihtiyaç duymamasına rağmen apoA1'in varlığı enzimin optimum aktivitesi ve stabilitesi için gereklidir. Serbest kolesterolün HDL'ye taşınması ile hücrelerden salınan PON1 aktivitesi belirgin olarak azalır (61). Serbest kolesterol HDL'nin dış lipid tabakasına yerleşir ve lipoprotein fonksiyonunu ters yönde etkiler. HDL2_kolesterol/serbest kolesterol oranı diabetik hastalarda belirgin olarak azalır (98). Sonuç olarak diabetik hastaların HDL'si optimum PON1 aktivitesi ve stabilitesi için uygunsuz bir ortam oluşturur.

2.11.2. PON1'in Okside LDL ile Etkileşimi:

HDL ile taşınan PON1, LDL'yi oksidasyondan korur. PON1 inhibitörlerinin ortama verilmesiyle, LDL oksidasyonunun artması, hem PON1 inaktivasyonuna hem de HDL lipidlerinin lipid peroksidasyonu oluşumuna katılmasına bağlıdır (99).

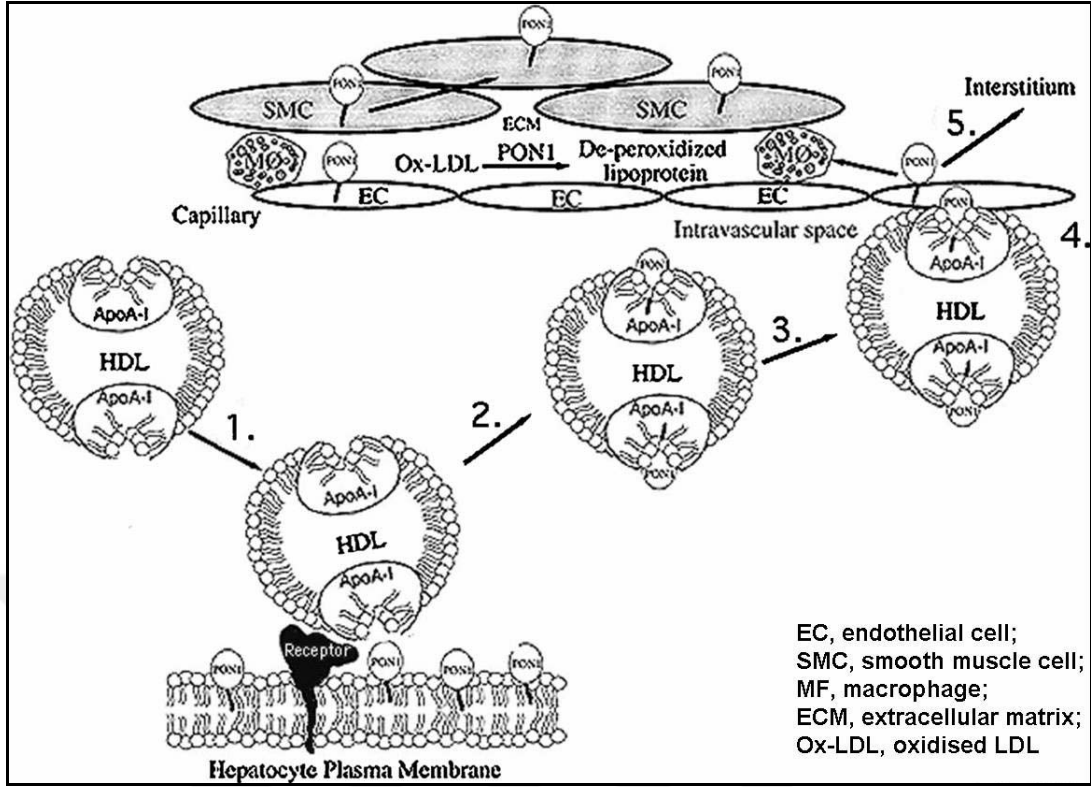
In vivo serum PON1'in başlıca görevi HDL'yi oksidatif hasarın zararlı etkilerinden korumaktır. Yapılan bir çok çalışma PON1'in sadece LDL oksidasyonunu değil, aynı zamanda HDL oksidasyonunu da önlediğini göstermiştir. Bu etki PON1'in lipoprotein-aracılı peroksitleri hidroliz edebilme özelliğine bağlıdır. PON paraoksanda bulunan O ve P arasındaki ester bağı hidroliz edebilen bir esterazdır. Benzer ester bağı lipoprotein kaynaklı fosfolipid peroksitlerinde ve kolesterol ester peroksitlerinde de bulunur. Okside lipoproteinlerde benzer bir kimyasal yapı PON1 için fizyolojik substrat olabilir. Okside HDL'ler üzerine PON1 etkisinden sonra, yağ asidi hidroperoksitlerinin birikimi azalır, bu ürünler hızla metabolize olurken, PON1 esteraz aktivitesi azalmamıştır.

PON1, lipoprotein kaynaklı peroksitlerin (kolesterol linoleat hidroperoksitleri) yanısıra hidrojen peroksiti (H_2O_2) de hidroliz eder.

Aterogenez sırasında endotel hücreleri tarafından üretilen başlıca reaktif oksijen türü (ROS) H_2O_2 'dir ve oksidatif stres altında LDL oksidasyonuna neden olarak subendotelyuma geçer. PON1'in H_2O_2 'i (peroksitlerle beraber) hidrolize etmesi, aterosklerozda rol alan potent oksidanların yok edilmesinde önemlidir. PON1, HDL fonksiyonları üzerinde koruyucu etkiye sahiptir. Bu etki PON1'in peroksidaz benzeri aktivitesiyle ve HDL'nin antiaterojenik özelliklerine katılmasıyla açıklanabilir (100).

N-terminalindeki hidrofobik sinyal peptidin, PON1'in, HDL ile birleşmesindeki potansiyel rolü ve oksidatif ve inflamatuvar hasar bölgelerine transferi şekil 2.11'de detaylı olarak gösterilmiştir (68).

PON1 ekspresyonu ve biyolojik fonksiyonları HDL ile ilişkili diğer proteinler tarafından etkilenebilmektedir. Örneğin, PON1 ancak HDL tarafından taşındıktan sonra, endojen substratı ile etkileşebilir ve biyolojik özelliklerini gösterebilir. Bu yüzden, PON1 ve HDL arasındaki ilişkinin anlaşılması, katalitik bileşenlerinin belirlenmesi açısından önemlidir. Diğer apoproteinler PON1 ve HDL ilişkisine katılabilir. İlginç bir şekilde, noniyonik deterjanların varlığında PON1 ve apoproteinler saflaştırılamamaktadır. Bu bulgulara ilaveten, enzimi apo AI'den ayırmak için noniyonik deterjanlar kullanmak gerekmektedir.



Şekil 2.11. PON1 salınımı, HDL ile ilişkisi ve lipid hasarının olduğu bölgelere taşınması. (1) HDL hücre yüzeyine geçici olarak bir reseptör aracılığıyla bağlanır. (2) PON1 hücre membranına hidrofobik N-terminal bölgesi ile asılarak HDL'ye taşınır ve burada apoA-I ile stabilize edilir. (3) PON1 intravasküler boşluğa HDL ile birlikte girer. (4) PON1 kolesterolün endotelial veya düz kas hücreleri tarafından reseptör aracılı alınması sırasında plazma membranlarında yer alan fosfolipidlere taşınabilir. (5) Bu sayede PON1 interstisyuma geçerek LDL birikimi ve oksidatif hasarın olduğu bölgelere ulaşır ve buralarda antioksidan etkilerini gösterebilir (64).

2.12. PON1 ve Ateroskleroz

PON1'in HDL üzerinde yer aldığı, lipid metabolizmasında önemli bir rol oynadığı ve ateroskleroz gelişimine karşı koruyucu olduğu Mackness ve ark. tarafından gösterilmiştir. Son 10 yıl içerisinde PON1'in vasküler dokuları oksidatif hasardan koruyucu etkisini gösteren birçok çalışma yapılmıştır. İnsan serum PON1 aktivitesi kardiyovasküler hastalıklar arasında bir ilişki bulunmaktadır (101,102). Aterosklerotik, hiperkolesterolemik ve diyabetik

hastalarda PON1 aktiviteleri düşük bulunmuştur (50,103-106). PON1 aktivitesi aynı zamanda aterosklerotik apolipoprotein E eksikliği bulunan fare ve proaterojenik dietle beslenen tavşanlarda düşük bulunmuştur (80,107). Klinik çalışmalar PON1 polimorfizmi ile kardiyovasküler hastalıklar arasında bir ilişki olabileceğini göstermektedir (31,41,108-113). Kardiyovasküler hastalıklar açısından risk faktörü olarak değerlendirildiğinde PON1 konsantrasyonu ve aktivitesinin genotipe oranla daha iyi bir gösterge olduğu bildirilmiştir (33,101). PON1'in aterosklerozdaki rolünü gösterebilmek için PON1 aşırı eksprese eden ve hiç eksprese etmeyen fare modelleri kullanılmıştır (114-116). PON1 knock-out farelerde çok hızlı bir şekilde ateroskleroz geliştiği gözlenirken aşırı PON1 ekspresyonu yapan farelerde mevcut aterosklerotik lezyonların küçüldüğü gözlenmiştir.

PON2 gen polimorfizmleri ile koroner kalp hastalıkları arasında ilişkiyi gösteren çok az çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalardan birinde PON2 Ser311 polimorfizmi ile KAH ilişkili olduğu gösterilmiştir (44,117).

İnflamasyon ateroskleroz gelişiminde önemlidir. Akut faz yanıtı ateroskleroz ve HDL molekülündeki değişimlerle ilişkilidir. Serbest kolesterol, serum amiloid A (SAA) ve apoJ artar; kolesterol, apoAI, LCAT, CETP ve hepatik lipaz azalır. HDL'nin ters kolesterol taşınımı ve LDL'yi oksidasyondan koruyucu etkisi kaybolur. HDL proteinindeki bu inflamatuvar değişimler hepatik mRNA üzerinden gerçekleştirilmektedir (56). Hamsterlar üzerinde yapılan bir çalışmada lipopolisakkarit, TNF (tümör nekroz faktör) ve IL-1'in (interlökin-1) dışarıdan verilmesi sonucunda hepatik mRNA seviyelerinde ve PON1 aktivitesinde azalma olmuştur. Bu sonuçlar ışığında PON1'in negatif akut faz yanıt proteini olabileceği düşünülmektedir. -162 promotor polimorfizmindeki gen dizisi IL-6 yanıt element ile benzerlik göstermektedir (17). Bu bölgenin PON1 ekspresyonunun IL-6 ile düzenlenmesindeki rolü mutlaka incelenmelidir. Sonuç olarak aterosklerotik süreç boyunca oluşan proinflamatuvar sitokinler PON1 üretimindeki etkileri ile hastalıkların gelişiminde etkili olabilirler.

2.13. Homosistein Metabolizmasında PON1'in Rolü

Hiperhomosisteinemi koroner kalp hastalığı gelişiminde bir risk faktörüdür (118). Homosistein methionin oranının yüksek olduğu durumlarda homosistein tiolakton üretilir. Homosistein tiolakton hücrelerde ve plazmada protein hasarına neden olur. Homosistein tiolakton ve LDL arasındaki etkileşim LDL'nin birikimine neden olur ve makrofajlar tarafından alımı artar (61). Serum homosistein tiolakton aktivitesi PON1 ile ilişkili olabilir. Lipid peroksitlerin yıkımına ek olarak PON1 aktivitesinin aterosklerozun önlenmesinde multifonksiyonel katalitik özelliklerinin olduğunu gösterir. Hiperhomosisteinemide lipid peroksitlere benzer şekilde PON1'in hepatik sentezi ve sekresyonu azalır (61). Sonuç olarak ortamda çok fazla miktarda PON1 substratı bulunması PON1 sentezini ve aktivitesini azaltabilir.

2.14. PON Salınımını Etkileyen Faktörler

In vitro deneyler PON1'in LDL lipid peroksidasyonunu inhibe edebileceğini ve LDL türevi okside fosfolipidleri inaktive edebileceği gösterilmiştir. Bu durum aterosklerozun başlangıcında rol alan okside lipidlerin serumdaki içeriğini potansiyel olarak azaltabilir.

Aterosklerozun batı dünyasında ölümlerin yaklaşık %50'sine neden olması, ayrıca organofosfatların çevresel bir risk faktörü olarak bulunması ve günümüz toplumumuzda terörist saldırılarda organofosfatların kullanılıyor olması PON1 enziminin önemini gittikçe artırmaktadır. Bu bağlamda, PON1 enzimi hem OP zehirlenmesi hem de ateroskleroz gelişimine karşı potansiyel terapötik bir ajan olarak kullanılabilir.

2.14.1. Çevresel Bileşikler

PON1 organofosfat zehirlenmesine karşı hayvanları koruyabilir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar, çevresel toksinlere maruz kalmış kişilerin serum PON1 aktivitelerinde bir düşüş olduğunu göstermiştir (119-121). Bu çalışmalardan birisinde, OP zehirlenmesine maruz kalmış 28 hastadaki PON1 aktivitesi kontrole göre daha düşük olarak bulunmuştur, ancak zehirlenmeden 6 ay sonra, 8 hastanın aktivite düzeyinin normale döndüğü

saptanmıştır. Bu durum, PON1 inhibisyonunun geri dönüşümlü olarak gerçekleştiğini göstermektedir (119).

PON1 aktivitesi bütünüyle kalsiyuma bağımlıdır ve EDTA PON aktivitesini geri dönüşümsüz olarak inhibe eder. Diğer katyonların da PON aktivitesi üzerine inhibitör etkileri bulunmaktadır. Civa, lantan, bakır, çinko ve baryum insan karaciğerinde PON1 aktivitesini inhibe etmektedir (122). Q192 polimorfizmi bulunan bireylerde yapılan çalışmada mangan, kobalt, kurşun ve nikelin de inhibitör etkileri olduğu gösterilmiştir (123). Civa ve bakırın inhibitör etkisini 285. pozisyondaki sistein aminoasiti üzerindeki serbest thiol grubuna bağlanarak yaptığı düşünülmektedir (122,123).

Klorlu su dezenfeksiyonunda yan ürün olarak oluşan ve hepatokarsinojenik etkileri olan dikloroasetik aside maruz bırakılan farelerin karaciğerlerinde PON1 mRNA düzeylerinin 50% azaldığı gözlenmiştir (124). Hepatotoksik ajan olan karbon tetraklorid'in farelere uygulanması sonucu hepatik PON düzeyleri >80% azalmıştır (125).

5 yıldan uzun süre iyonizan radyasyona maruz kalan radyologlarda paraoksonaz ve arilesteraz düzeylerinin azaldığı gözlenmiştir (19). Yapılan diğer bir çalışmada ise, radyasyona maruz kalan işçilerin PON1 aktivitesi kontrol grubuna göre % 30 daha düşük olarak bulunmuştur (120).

2.14.2. İlaçlar

PON1 ile ilgili ilaç çalışmalarının büyük bir çoğunluğu kolesterol düşürücü ilaçlarla yapılmıştır. Statin ve fibratlarla yapılan bu çalışmalarda birbirinden farklı sonuçlar elde edilmiştir. HuH7 insan hepatoma hücrelerine in vitro olarak pravastatin, simvastatin ve fluvastatin (10–100 mM) verilmesi sonucunda PON1 aktivitesi ve PON1 mRNA düzeylerinde 25–50% azalma meydana gelmiştir. Her iki etki de mevalonat uygulanması ile geriye dönmüştür (26). Aynı hücrelerde fenofibrik asit (250 mM) verilmesi ile PON1 aktivitesinde %50, mRNA düzeyinde ise 30% artma meydana gelmiştir (26). Fenofibrik asit PON1 geninin promotor bölgesini uyarırken statinler tam tersi etki gösterirler.

Daha sonra yapılan çalışmalarda ise tam tersi etkiler görülmüştür. Hepatik insan HepG2 hücrelerine simvastatin (1.5–25 mg/ml) verilmesi sonucunda PON1 promotor aktivitesinde artma olmuştur (27). Bir başka çalışmada ise atorvastatin (5–50 mM) ve gemfibrozilin (2–80 mM) HDL bağımlı PON aktivitesini artırdığı bulunmuştur (126).

İnsanlarda yapılan çalışmalarda simvastatin ve diğer statinlerin, gemfibrozil ve fenofibratin serum PON1 aktivitesini artırdığı saptanmıştır (27,127-129)

Kolinerjik muskarinik antagonist olan atropin insanda PON1 aktivitesini inhibe etmektedir (130). Aspirin kullananlar arasında yapılan kohort çalışmada PON1 aktivitesi ve konsantrasyonunda belirgin bir artış olmuştur (131). Bu etki aspirinin anti inflamatuvar etkisinden kaynaklanabilir, ayrıca aspirin de antioksidan gibi davranabilir (131). Son olarak antiinflamatuvar glukokortikoid dexametazon (1 mM) fare hepatoma hücrelerinde PON1 mRNA düzeyinde 8 kat artışa yol açmıştır (132).

2.14.3. Alkol Tüketimi

Ortalama alkol tüketiminin potansiyel yararları konusunda birçok tartışma vardır. Bununla birlikte alkolün koroner arter hastalığı gelişiminde riski azaltabileceği yönündeki mekanizmalar çok iyi anlaşılmamıştır. Van der Gaag ve ark., (133) günlük 40 g alkol alımının PON1 aktivitesini ve kütlesini artırdığını göstermiştir. Kırmızı şarap, bira ve viski arasında herhangi bir farklılığın olmaması, kırmızı şaraptaki polifenollerin tek başına bu etkiyi yapamayacağını düşündürür. Ortalama alkol alımı serum HDL-kolesterol düzeyini ve apoA1 konsantrasyonunu anlamlı şekilde artırır (133,134). Artmış serum PON1 düzeyi, ortalama alkol alanlarda koroner arter hastalığı riskini azaltan faktörlerden birisi olabilir.

2.14.4. Sigara

Sigara dumanı ekstraktının PON1 aktivitesini in vitro olarak inhibe ettiği bilinmektedir (135) ve sigara içmenin enzim aktivitesine in vivo olarak zarar verebileceği düşünülmektedir. James ve ark., (136) PON1 serum

konsantrasyonunun ve aktivitesinin sigara içenlerde içmeyenlere göre azaldığını göstermiştir. Sigara içenler ile içmeyenler arasında PON1 aktivitesi ve serum düzeyi açısından yapılan çalışmada PON1'in sigaradan geri dönüşümlü olarak etkilendiği gösterilmiştir. Sigaranın bu azaltıcı etkisi son yıllarda yapılan çalışmalarla da doğrulanmıştır (137-140). İlginç olan, alkolle birlikte sigara içen kişilerde (139) yada düzenli egzersiz yapan (138) kişilerde PON1 düzeyi hiç sigara içmeyenlerinkiyle benzer bulunmuştur bu da bu faktörlerin sigaranın PON1 üzerine olan olumsuz etkisini azalttığını göstermiştir.

2.14.5. Diyet

Hem tavşan hem de transgenik fare modellerinde, proaterogenik diyet HDL-kolestroldeki azalmayla ilişkili olarak PON1 aktivitesinde anlamlı bir düşüşe neden olur (107,141-143). Trans-doymamış yağ içeriği yüksek olan diyetler PON1 aktivitesini azaltabilir ancak zeytin yağındaki oleik asit PON1 aktivite artışına neden olur (144,145). Okside yağ oranı yüksek olan besinlerle beslenen sağlıklı kişilerde PON1 aktivitesinde anlamlı bir düşüş gözlenmiştir. Bu durum PON1'in okside lipidler ve okside LDL tarafından inaktive olduğunu gösteren in vitro çalışmalarla uyumludur (146).

PON1 oksidasyon ile inaktive olmaya oldukça duyarlıdır. PON1 aktivitesinin in vitro olarak antioksidan polifenollerden quercetin ve glabridin tarafından korunması diyetle alınan antioksidanların da in vivo koşullarda benzer bir rol oynayacağını gösterir (146). Polifenoller ve diğer antioksidanlardan zengin nar suyunun tüketimi hem insanda hemde apoE knockout farelerde PON1 aktivitesini % 20 artırmıştır (147). Benzer olarak quercetin veya kırmızı şarap ile beslenen farelerde etanolle beslenenlere oranla sırasıyla % 113 ve %75 artış görülmüştür (148). Son zamanlarda yapılan çalışmalar diyetle alınan polifenollerin PON1 gen ekspresyonunu da etkileyebileceğini göstermiştir (149). Quercetin ve naringenin HuH-7 hücrelerinde PON1 promotor aktivitesini uyarmaktadır. Quercetin ve naringenin aril hidrokarbon reseptörü (AhR) için ligand gibi davranır. AhR'ün aşırı ekspresyonu, polifenoller tarafından PON1 geninin indüksiyonunu artırır.

Aril hidrokarbon reseptörünün, özellikle PON1 promotorundaki ksenobiyotik yanıt elementinin (XRE) bağlandığı benzer dizilere bağlanması, polifenollerce indüklenen PON1 gen ekspresyonu için gerekli bir mekanizmadır.

A.B.D.'nde 189 beyaz erkek üzerinde yapılan bir çalışmada dietle ve ilaçlarla alınan C ve E vitaminleri ile PON1 aktivitesi arasında korelasyon olduğu gösterilmiştir (127).

İştah ve enerji tüketimini düzenleyen bir hormon olan leptinin ratlara enjekte edilmesi sonucunda PON1 aktivitesinde anlamlı bir azalma ve oksidatif strese artış saptanmıştır (150).

2.14.6. PON1 ve Yaşlanma

PON1 aktivitesinin belirlenmesinde yaş önemli bir faktördür. Yapılan çalışmalarda karaciğer PON1 aktivitesi doğumda oldukça düşük iken doğum sonrasında artmaya başlar, 6 ve 15. ay arasında sabit kalır (151-155). Paraoksonaz aktivitesi, yeni doğanlarda ve prematüre bebeklerde yetişkindeki yaklaşıklık yarısı kadardır. Prematür bebeklerde term bebeklere oranla %24 daha düşük aktivite saptanmıştır (155). Doğumdan yaklaşık bir yıl sonra erişkindeki düzeyine ulaşır ve hayat boyu değişmeden devam eder (36). PON1 aktivitesi fetusda daha da düşüktür. Gelişim sürecinde düşük PON1 aktivitesine sahip olanlar organik fosforlu insektisidlere bağlı zehirlenmelerden daha fazla etkilenirler, burada PON1'in koruyucu etkisi olduğu unutulmamalıdır (2,152,156).

PON1 aktivitesi erişkin dönemde sabit kalır. Farelerde yapılan çalışmalarda 3 ve 24 aylık farelerin plazma ve karaciğer PON1 aktivitelerinde bir fark bulunamamıştır (156). Yaşlanmayla birlikte PON1 aktivitesinde düşüş olduğunu gösteren birçok çalışma vardır (157-160). Bu durum yaşlı hastalarda HDL'nin oksidasyona duyarlılığındaki artış ile ilişkilidir (158). PON1 Q192R polimorfizmi yaşa bağlı gözlenen aktivite kaybında önemli bir rol oynar. QQ homozigotlar yaşla birlikte aktivitede daha büyük bir kayıp gösterirler (160). PON1 192Q daha ileri yaşlarda açığa çıkarken, çok geniş bir gen bölgesiyle yapılan bir çalışma R alelinin popülasyonun geneliyle

karşılaştırıldığında ileri yaşlardaki bireylerde daha yaygın olduğu gösterilmiştir (159,161).

PON1 aktivitesindeki azalma yaşlanmaya bağlı artan oksidatif hasarın sonucu olabilir ve yaşlanmayla artan sıklıkta görülen aterosklerozun nedeni olabilir.

2.14.7. PON1 ve Cinsiyet

Farelerde yapılan çalışmalarda dişi farelerin PON1 aktivitesinin erkeklere oranla %14-26 daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Erkek hayvanlarda gonadektomi sonrasında PON1 aktivitesinde artış olurken dişilerde böyle bir etki görülmemiştir (162). İnsanlarda genetik farklılıklardan dolayı cinsiyetin PON1 aktivitesi üzerine etkisini saptamak oldukça zordur. Fakat yapılan bir kaç çalışmada kadınlarda ortalama PON1 aktivitesinin erkeklere oranla biraz daha yüksek olduğu gösterilmiştir.

2.14.8. Fizyolojik koşullarda PON1 aktivitesi

PON1 aktivitesi çeşitli fizyolojik koşullarda değişebilmektedir. Hamilelikte hem insanlarda hem hayvanlarda PON1 aktivitesi azalır (163). Egzersiz PON1 aktivitesi düşük olan sigara içenlerde PON1 aktivitesini %14 artırarak sigara içmeyenlerin seviyesine yükseltir (138). Başka bir çalışmada ise egzersiz ile PON1 aktivitesi arasında herhangi bir ilişki bulunamamıştır (137).

2.15. Çeşitli Hastalıklarda PON

2.15.1. Diabetes Mellitus

Bir çok çalışmada tip I ve II diabetli hastalarda serum PON1'in azaldığı gösterilmiştir (105,106,164-167). Bunun tam aksini gösteren çalışmalar da yapılmıştır (168,169). Boemi ve ark. (105) PON1 aktivitesinin azalarak antioksidan kapasitenin azalmasına ve sonuç olarak diabetlilerde oksidatif hasara neden olduğunu göstermişlerdir. Aktivite üzerindeki bu etki genotipten bağımsız olarak gerçekleşmektedir (105,106,166,167). Buna rağmen PON155L diabet komplikasyonlarından biri olan retinopati ile birliktelik

göstermektedir (164,170,171). PON192R ile diabetli hastalarda koroner kalp hastalığı görülmesi arasında ilişki bulunmaktadır (106,172,173). L55M polimorfizmi ile bozulmuş glukoz toleransı ve β hücre fonksiyonu ve artmış insülin direnci arasında ilişki bulunmuştur (174-176). Diabetli hastalarda PON1 aktivitesinin azalmasının mekanizması tam olarak anlaşılamamasına rağmen kan glukoz konsantrasyonunun artmasına bağlı olduğu düşünülmektedir. Glikasyon sonucunda PON1 inaktive olur ve HDL'deki lipid peroksidasyonu artar (177,178). Glikasyona uğrayan HDL'nin oksidasyona karşı koruyucu rolünde azalma meydana gelir (177). PON1 aktivitesi ve konsantrasyonu açlık kan glukozu yükselmiş sağlıklı kişilerde düşük bulunmuştur. PON1 aktivitesi açlık kan glukozunun yükseldiği ve insülin direnci ile karakterize metabolik sendromlu hastalarda da düşük bulunmuştur (179).

2.15.2. Diğer Hastalıklar

Oksidatif stres demans gelişiminde bir faktördür. PON1 aktivitesi vasküler demans ve Alzheimer hastalığında azaldığı gösterilmesine rağmen bunun bir neden mi yoksa artan oksidasyon sonucu mu olduğu tam olarak açıklanamamıştır (180,181). PON192R ve PON1-108T ile vasküler demans ve Alzheimer hastalığı arasında ilişki bulunmuştur (182,183). Sporadik idiopatik Parkinson olgularında PON1 ile metabolize olan çevresel nörotoksinlerin yaşla birlikte nörodejenerasyondan sorumlu tutulabileceği ve B allelin Parkinson hastalığına genetik yatkınlık oluşturabileceği ileri sürülmüştür (184,185).

Kronik renal yetmezlikte oksidatif strese bağlı PON1 aktivitesinde azalma gözlenmiştir (186-189). Yapılan bir çalışmada PON1 aktivitesinin böbrek transplantasyonu sonrasında normale döndüğü gösterilmiştir. Ateroskleroz riski bulunan üremik renal transplantlı olgularda düşük PON/HDL, PON/apoAI oranları izlenerek bu olgularda HDL'nin antioksidan kapasitesinin azaldığı görülmüştür (184).

Antikardiolipin antikoları pozitif bulunan bir grup hastada modifiye LDL'ye karşı otoantikoların arttığı, PON1 aktivitesinin belirgin olarak düştüğü

ve arteriyel tromboz geliştirme riski yüksek olan R genotipinin de artma eğiliminde olduğu görülmüştür (186). Sistemik amiloidozda da düşük PON aktivitesi bildirilmiştir.

Sistemik infeksiyon ve inflamasyonda serum PON1 seviyesi ve ekspresyonu azalır (56,57). Bu değişiklikler HDL ile birlikte bulunan apolipoprotein AI, lesitin kolesterol açıltransferaz, kolesterol ester transfer protein gibi diğer proteinlerde de görülmüştür. Sonuç olarak HDL'nin antioksidan etkisi azalır ve ateroskleroz gelişim riski artar. PON1'in sepsiste rolü hala araştırılmaktadır.

Karaciğer sirozu, kronik hepatit, HDL eksikliği, anksiyete ve Körfez savaşı sendromu gibi birçok hastalıkta da PON1 aktivitesinde değişimler gözlenmiştir (121,125,190-193).

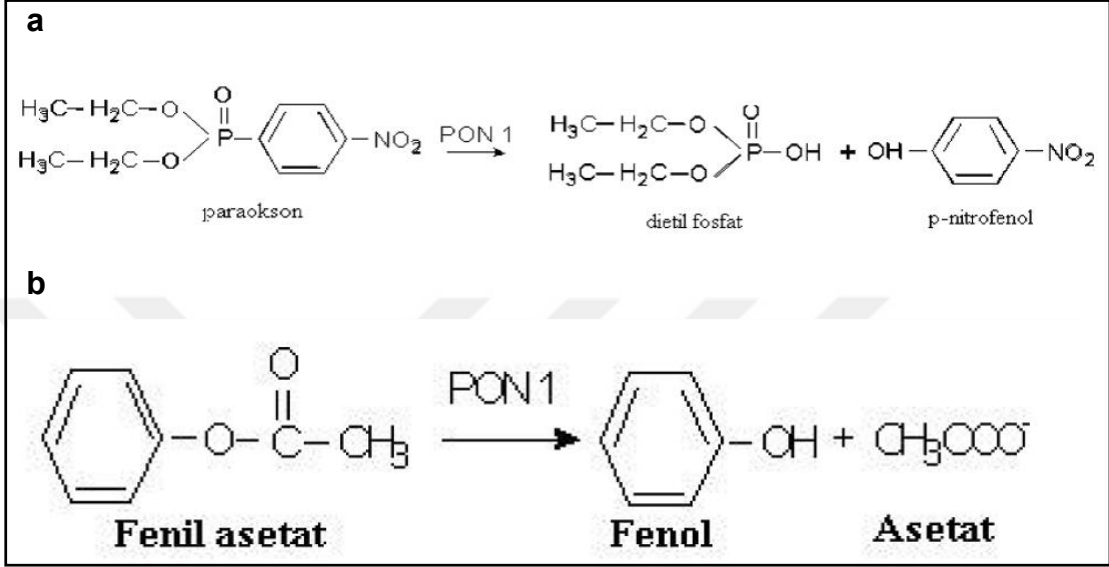
2.16. Ölçüm Yöntemleri

Organofosfat bileşiklerinden parationun (parathion) aktif katabolik metaboliti olan paraokson (o,o-dietil-o-p-nitrofenil fosfat), enzime adını verdiği gibi, aktivite tayininde de en çok kullanılan substratlardan birisidir. (Şekil 2.12)

Paraoksonaz aktivite ölçümlerine ait metodlar Eckerson (194), Furlong (151) ve Smolen (195) tarafından geliştirilmiştir. Paraoksonaz enzim aktivitesi ölçümünde, substrat olarak paraokson gibi organofosfatların enzimatik hidrolizi sonucu oluşan 4-nitrofenolün spektrofotometrik ölçümü esas alınmaktadır. Arilesteraz ölçümünde ise substrat olarak paraokson yerine fenil asetat kullanılmakta ve oluşan fenol ölçülmektedir.

Eckerson ve ark. (194) paraoksonaz aktivitesi ölçümlerinde Krisch (196)'den modifiye ettikleri bir metod uygulamışlardır. Bu metodda 1 mmol/L paraokson ve 1 mmol/L CaCl_2 içeren pH sı 10.5 olan 0.05 mol/L glisin tamponu kullanılarak bazal aktivite ve aynı solüsyona 1 mol/L NaCl ilavesi ile NaCl ile stimüle edilen paraoksonaz aktivitesi 25 °C'de 412 nm dalga boyunda ölçümlerle tespit edilmiştir. Krisch (196) ise ölçümlerinde 0.15 mol/L NaCl içeren glisin tamponu kullanmıştır. Zech ve Zurcher (197) pH sı 7.2 olan trietanolamin tamponu kullanarak paraoksonaz ölçümlerini yapmışlardır.

Juretic ve ark. (1) ise paraoksonaz aktivite ölçümlerinde glisin tamponu yerine pH sı 8 olan Tris-HCl tamponu kullanmışlardır. Farklı literatürlerde sunulan metodoloji farklı olduğu için ölçüm sonuçlarının güvenilirliği azalmaktadır. Paraoksonaz enzim aktivitesi -20°C'de 1 yıl stabildir.



Şekil 2.12. Paraoksonaz aktivite tayininde kullanılan substratlar.

Aromatik karboksilik asit esterlerinden fenil asetat, enzimin arilesteraz aktivitesinin tayininde sıklıkla kullanılmaktadır (Şekil 2.12b). EDTA varlığında, plazma ve karaciğer dokusu PON-1 aktivitesinin inhibe olduğu bildirilmektedir. Bu nedenle aktivite tayini heparinli plazmada ve tercihen serumda yapılmaktadır. Plazma ve karaciğer PON1 aktivitesi, p-hidroksimerküri benzoat veya civa varlığında nonkompetitif olarak inhibe olmaktadır (198).

Bizim çalışmamızda PON1 ve arilesteraz aktivite ölçümlerinde yarı otomatize microplate yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem sayesinde çok sayıda örneği kısa bir sürede ölçmek mümkündür. Klasik yöntemde her bir örneğin paraoksonaz aktivitesini manuel olarak ölçmek ortalama 25-30 dk sürmektedir. Bu nedenle örnek sayısı arttıkça çalışma süresi ve hata yapma olasılığı artacaktır. Tam otomatize sistemlerde (Cobas Mira) bu sorun ortadan kaldırılmıştır. Fakat kullanılan substratın (paraoxon) oldukça toksik

olması ve cihazın temizlenmesi için kullanılan 2M NaOH'in koroziv etkisinden dolayı zamanla cihazın aparatlarında aşınmalar meydana gelir. Sonuç olarak cihazda sadece PON1 çalışmak zorunda kalırız. Yarı otomatize (semiautomated) sistemler de ise microplate'de 96 örnek ortalama 20-30 dk içerisinde aynı anda çalışılmaktadır. Klasik yöntemle yarı otomatize metod arasında sonuçlar açısından belirgin bir farklılık olmadığı görülmüştür (199).

Yarı otomatize microtiter metodu çok sayıda örnekte (120 örnek/saat) PON1 aktivitesinin çalışılması için oldukça güvenilir bir yöntemdir. Ayrıca Cobas Mira gibi otomatik analizörlerden daha ucuz bir yöntemdir.



3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Gereçler

3.1.1. Çalışma Grubu:

Çalışmada 3 farklı yaş aralığına göre gruplar oluşturuldu. Genç erişkin grubu 20-44 yaş arası (ortalama yaş = 30.12 ± 6.6) 49 sağlıklı kişiden, erişkin grubu 45-64 yaş arası (ortalama yaş = 52 ± 5.6) 25 sağlıklı kişiden, yaşlı grubu ise 65 yaş üzeri (ortalama yaş = 78.94 ± 6.2) 113 kişiden oluşturuldu. Kişilerin kan örneklerini alabilmek için Gülhane Askeri Tıp Akademisi Etik Kurulunun 24/02/2006 tarih ve 55 sayılı onayı alınmıştır. Kan örnekleri alınmadan önce gönüllülere rıza belgesi okutularak imzalatılmıştır. Yaşlı grubu için Emekli Sandığı'ndan özel izin alınarak Ankara 75.yıl Huzurevinde kalan sakinlerden, diğer yaş grupları için Gülhane Askeri Tıp Akademisi kan alım merkezine başvuran sağlıklı kişilerden kan örnekleri alınmıştır.

3.1.2. Kimyasal Maddeler

Phenyl acetate, 4-Nitrophenyl acetate, Eserine, Paraoxon-ethyl, tris-HCL, kalsiyum klorür, sodyum klorür, Sigma'dan temin edildi.

3.2. Yöntemler

3.2.1. Örneklerin Toplanması

12 saat açlıktan sonra kişilerden serum analizleri (glukoz, total kolesterol, HDL-K, LDL-K, VLDL-K ve trigliserit) ve PON1 ile ARE düzeyleri çalışılmak üzere kan örnekleri alındı. Serum analizleri için alınan kan örnekleri herhangi bir materyal içermeyen düz biyokimya tüplerine alındı. Biyokimya tüplerine alınan kanlar 30 dakika bekletildikten sonra 1800 xg'de 10 dakika santrifüj edilerek serumları ayrıldı. Serumlar iki kısma bölünerek; birinci kısım serumlar bekletilmeden biyokimyasal parametreler çalışıldı. Diğer serumlar ise PON1 ve ARE aktiviteleri çalışılmak üzere -80°C 'de saklandı. Serumlar alındıktan sonra bir ay içinde paraoksonaz aktivitesi ve fenotip tayinleri yapıldı.

3.2.2. Paraoksonaz Aktivite Ölçümü

PON1 aktivitesi substrat olarak kullanılan paraoksonun (O,O-diethyl-O-p-nitrophenyl phosphate; Sigma Co, London, UK.) enzimatik olarak hidrolizi sonucu oluşan 4-nitrofenolün, ELISA okuyucuda 405 nm'de spektrofotometrik olarak ölçümü ile belirlenmiştir (199).

3.2.2.1. Kullanılan Çözeltiler

Paraokson stok çözeltisi

0,1 M paraokson çözeltisi metanolde hazırlandı ve -20°C'de derin dondurucuda saklandı.

MA: 275 d: 1,2703 g/L %90

Tris-HCL tampon çözeltisi

0,1 M tris-HCL çözeltisi hazırlandı, pH'sı 37°C'de konsantre HCL ile 8'e ayarlandı ve buzdolabında saklandı.

Stok kalsiyum klorür çözeltisi

0,1 M Stok kalsiyum klorür çözeltisi 0,1 M, pH:8 Tris-HCL çözeltisinde hazırlandı, buzdolabında saklandı.

Stok sodyum klorür çözeltisi

Stok 5 M sodyum klorür çözeltisi 0,1 M, pH:8 Tris-HCL çözeltisinde hazırlandı, buzdolabında saklandı.

5×10^{-5} M p-nitrofenol çözeltisi

5×10^{-5} M p-nitrofenol çözeltisi 0,1 M, pH:8 Tris-HCL çözeltisinde hazırlandı. Bu çözelti paraoksonaz aktivitesi için molar ekstinksiyon katsayısını belirlemede kullanıldı.

3.2.2.2. Molar Ekstinksiyon Katsayısının Hesaplanması

2 mM kalsiyum klorür ve 5×10^{-3} M p-nitrofenol içeren reaksiyon çözeltisi 0,1 M, pH:8 Tris-HCL tampon çözeltisinde hazırlandı. ELISA okuyucuda 405 nm'de 25°C'de 2mM kalsiyum klorür içeren 0,1 M, pH:8 Tris-HCL çözeltisinden oluşan köre karşı absorbans okundu. $A=E \times C \times l$ formülü kullanılarak paraoksonaz aktivitesi için molar ekstinksiyon katsayısı hesaplandı. Bu formülde;

A=Absorbans

E=Molar ekstinksiyon katsayısı

C=Madde molar konsantrasyonu

l=Işık yolu

Paraoksonaz aktivitesi hesaplanmasında kullanılan molar ekstinksiyon katsayısı $E=17120 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ olarak bulundu.

3.2.2.3. Deneyin Yapılışı

2 mM paraokson, 2 mM kalsiyum klorür içeren 0,1 M, pH:8 Tris-HCL çözeltisi günlük taze olarak hazırlandı. Hazırlanan bu reaksiyon çözeltisi 25°C sıcaklığındaki su banyosunda bekletildi. Microplate üzerindeki kuyucuklara 10 µl serum alınarak üzerine 200 µl reaksiyon çözeltisi eklenip karıştırılarak ELISA okuyucuda 405 nm'de 25°C'de 1'er dakika aralıklarla 5 dakika süreyle köre karşı absorbans değerleri kaydedildi. Kör 2 mM kalsiyum klorür içeren 0,1 M, pH:8 Tris-HCL çözeltisidir. Ölçüm tekniğinden kaynaklanabilecek hataları önlemek için her serum iki kez ölçülerek ortalama absorbans değeri alındı. Paraoksonaz aktivitesi aşağıdaki formülle hesaplandı.

$$V = \frac{(\Delta A/dk) \times a}{E \times b \times d} \times 10^6$$

Bu formülde;

a: Test solüsyonunun toplam hacmi (mikrolitre)

b: Test solüsyonundaki serum miktarı (mikrolitre)

d: Spektrofotometredeki ışık yolu (santimetre)

E: Molar ekstinksiyon katsayısı

$\Delta A/dk$: 1 dakikadaki ortalama absorbans artış değeri

V: Enzim aktivitesi (µmol/dk/ml serum)

Bir ünite (U) paraoksonaz aktivitesi dakikada oluşan 1 nmol p-nitrofenole eşittir ve aktivite genellikle ml serum başına ünite (U/ml) cinsinden ifade edilir.

3.2.3. Paraoksonaz + Sodyum Klorür Aktivitesi Ölçümü

2 mM paraokson, 2 mM kalsiyum klorür ve 1 M sodyum klorür içeren 0,1 M, pH:8 Tris-HCL çözeltisi günlük taze olarak hazırlandı. Hazırlanan bu reaksiyon çözeltisi 25°C sıcaklığındaki su banyosunda bekletildi. Microplate üzerine 10 µl serum alınarak üzerine 200 µl reaksiyon çözeltisi eklenip karıştırılarak ELISA okuyucuda 405 nm'de 25°C'de 1'er dakika aralıklarla 5 dakika süreyle köre karşı absorbans değerleri kaydedildi. Kör 2 mM kalsiyum klorür ve 1 M sodyum klorür içeren 0,1 M, pH:8 Tris-HCL çözeltisidir. Ölçüm tekniğinden kaynaklanabilecek hataları önlemek için her serum iki kez ölçülerek ortalama absorbans değeri alındı. Paraoksonaz aktivitesi aşağıdaki formülle hesaplandı.

$$V = \frac{(\Delta A/dk) \times a}{E \times b \times d} \times 10^6$$

3.2.4. Arilesteraz Aktivitesi Ölçümü

ARE aktivitesi substrat olarak kullanılan fenilasetatın (Sigma Co, London, UK.) enzimatik olarak hidrolizi sonucu oluşan fenolün ELISA okuyucuda 270 nm'de spektrofotometrik olarak ölçümü ile belirlenmiştir (199).

3.2.4.1. Kullanılan Çözeltiler

Stok 0.5 M fenil asetat çözeltisi

MA: 136,14; d:1,08 g/l olan fenil asetat kullanılarak 0,5 M çözelti etanolde hazırlandı. Derin dondurucuda saklandı.

Stok 0,1 M kalsiyum klorür çözeltisi

MA: 147,02 olan kalsiyum klorür kullanılarak 0,1 M çözelti distile su ile hazırlandı.

20 mM pH: 8 Tris HCL tampon çözeltisi

20 mM Tris distile suda çözülerek hazırlandı. Su banyosunda 37°C'ye kadar ısıtılarak konsantre HCL ile pH'sı 8'e ayarlandı. Kullanılincaya kadar buzdolabında saklandı.

7×10^{-2} M fenol çözeltisi

Önce 7×10^{-2} M stok fenol çözeltisi tris-HCL tampon çözeltisinde hazırlandı. Bu çözelti kullanılarak arilesteraz aktivitesi için molar ekstinksiyon katsayısını belirlemede kullanılan 5×10^{-4} M fenol çözeltisi hazırlandı.

3.2.4.2. Molar Ekstinksiyon Katsayısının Hesaplanması

0,9 mM kalsiyum klorür ve 5×10^{-4} M fenol içeren reaksiyon çözeltisi 20 mM, pH:8 Tris-HCL tampon çözeltisinde hazırlandı. ELISA okuyucuda 270 nm'de 25°C'de 0,9 mM kalsiyum klorür içeren 20 mM, pH:8 Tris-HCL çözeltisinden oluşan köre karşı absorbans okundu. $A = E \times C \times l$ formülü kullanılarak arilesteraz aktivitesi için molar ekstinksiyon katsayısı hesaplandı. Bu formülde;

A=Absorbans

E=Molar ekstinksiyon katsayısı

C=Madde molar konsantrasyonu

l=Işık yolu

Arilesteraz aktivitesi hesaplanmasında kullanılan molar ekstinksiyon katsayısı $E = 1289 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ olarak bulundu.

3.2.4.3. Deneyin Yapılışı

Serumlar 1/100 (v/v) oranında distile su ile dilüe edildi. 1 mM fenil asetat ve 0,9 mM kalsiyum klorür içeren 20 mM pH: 8 Tris-HCL tampon çözeltisi hazırlandı. Reaksiyon çözeltisinin ısısı su banyosunda sürekli 25°C'de tutuldu. Microplate üzerindeki kuyucuklara 10 µl dilüe serum alınarak üzerine 200 µl reaksiyon çözeltisi eklenip karıştırılarak ELISA okuyucuda 270

nm'de, 25°C'de 1'er dakika arayla 5 dakika boyunca köre karşı absorbansları ölçüldü. Kör 0,9 mM kalsiyum klorür içeren 20 mM pH: 8 Tris-HCL tampon çözeltisidir. Ölçüm tekniğinden kaynaklanabilecek hataları önlemek için her serum iki kez ölçülerek ortalama absorbans değeri alındı.

Arilesteraz aktivitesi aşağıdaki formülle hesaplandı.

$$V = \frac{(\Delta A/dk) \times a}{E \times b \times d} \times 10^6$$

Bir ünite (U) arilesteraz aktivitesi dakikada hidroliz olan 1 mmol fenil asetata eşittir. Arilesteraz aktivitesi genellikle ml serum başına ünite (U/ml) cinsinden ifade edilir .

3.2.5. Paraoksonaz Fenotip Dağılımı:

Paraoksonaz aktivitesinin fenotip dağılımı, dual substrat metodu ile saptandı. (194). 1 M NaCl varlığında paraoxonun hidrolizinin (Tuz ile uyarılan PON aktivitesi), fenilasetatın hidrolizine (arilesteraz aktivitesi) oranı 3 olası fenotipten (AA, AB ve BB fenotipleri), bireyin ait olduğu fenotipi belirleyecektir (195). AA fenotipi homozigot düşük aktivite, AB fenotipi heterozigot aktivite, BB fenotipi homozigot yüksek aktivite gösterir.

$$R = \frac{\text{Tuz ile uyarılan PON aktivitesi}}{\text{Arilesteraz aktivitesi}}$$

Cut-off değerleri:

AA fenotipi için $R < 3.0$

AB fenotipi için $7.0 > R > 3.0$

BB fenotipi için $R > 7.0$

3.2.6. Diğer Laboratuvar Ölçümleri:

Alınan kan örnekleri GATA Merkez Biyokimya Laboratuvar'ında aynı gün çalışıldı. Total Kolesterol CHOD-PAP enzimatik kolorimetrik metod ile, trigliserid GPO-PAP enzimatik kolorimetrik metod ile, HDL-Kolesterol enzimatik inhibisyon testi ile, tümü Olympus marka ticari kit kullanılarak, Olympus AU 2700 otoanalizörde çalışıldı. LDL_Kolesterol düzeyi, Friedewald formülüne göre ($LDL_K = Total_K - (HDL_K + TG/5)$) otomatik olarak hesaplandı.

3.2.7. İstatistiksel Analiz:

İstatistiksel değerlendirme SPSS 12.0 (Chi, ILL, USA) paket programı kullanılarak yapıldı. Sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma, frekans, yüzde olarak verildi. Gruplar arası karşılaştırmalarda sürekli değişkenler için tek yönlü varyans analizi testi kullanıldı. Alt grupların karşılaştırmaları Tukey testi ile yapıldı. Nominal (kesitli) değişkenlere ait karşılaştırma ki-kare testi ile yapıldı. İstatistiksel önemlilik için $p < 0.05$ kabul edildi.

4. BULGULAR

Bu çalışmada yer alan 187 kişi (67 erkek ve 120 kadın) yaşlarına göre 3 farklı gruba ayrılmıştır. Genç erişkin (n=49; $20 \leq \text{yaş} \leq 44$ ortalama yaş = 30.12 ± 6.6), erişkin (n=25; $45 \leq \text{yaş} \leq 64$ ortalama yaş = 52 ± 5.6) ve yaşlı (n=113; $65 \leq \text{yaş} \leq 95$ ortalama yaş = 78.94 ± 6.2). Gruplar içindeki erkek ve kadın oranları sırasıyla grup1'de % 40.8 ve %59.2, grup2'de %36.0 ve %64.0, grup3'de %33.6 ve %66.4 bulunmuştur.

Çalışmaya katılan bireylerin demografik ve biyokimyasal verileri tablo 4.1'de verilmiştir. Vücut kitle indeksi grup3'de grup2'ye göre anlamlı olarak yüksek tespit edildi (Tablo 4.1; $p < 0.05$).

Çalışmaya katılan bireylerin lipid parametreleri, PON ve ARE aktiviteleri karşılaştırıldığında; grup3'de total kolesterol ve LDL-kolesterol seviyeleri grup2'ye göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha düşük bulunmuştur. Gruplar arasında serum trigliserid, HDL-kolesterol, VLDL-kolesterol, arilesteraz, bazal ve tuzla uyarılmış paraoksonaz seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır (Tablo 4.1; $p > 0.05$). Serum total kolesterol, HDL-kolesterol, paraoksonaz, 1M NaCl ile uyarılmış paraoksonaz ve arilesteraz aktivitesinin yaşa bağlı değişimleri şekil 4.1-5'de gösterilmiştir.

Sigara içenlerin oranı her bir grupta sırasıyla %32.7, %20 ve %1 olarak bulunmuştur. Günde içilen sigara adetlerinde grup3'de grup2'ye göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma bulundu (Tablo 4.1; $p < 0.001$). Sigara içenler ile içmeyenlerin lipid parametreleri, paraoksonaz ve arilesteraz aktiviteleri karşılaştırılmış ve sonuçlar tablo 4.2'de verilmiştir. Buna göre PON, arilesteraz, LDL-K, HDL-K, Trigliserid seviyeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır (Tablo 4.2. $p > 0.05$).

Cinsiyetler arasında yapılan PON aktivitesi karşılaştırmasında erkekler ile kadınlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p > 0.05$).

Ayrıca bireylerin rutin testleri de yapılarak yaşa bağlı değişimler incelenmiştir. Buna göre Grup3'de yer alan bireylerin serum glukoz seviyesi,

grup1'e göre istatistiksel olarak anlamlı bir yükseklik göstermiştir (Tablo 4.1; $p < 0.001$).

Tablo 4.1. Grupların demografik özellikleri, lipid parametreleri, paraoksonaz ve arilesteraz aktiviteleri.

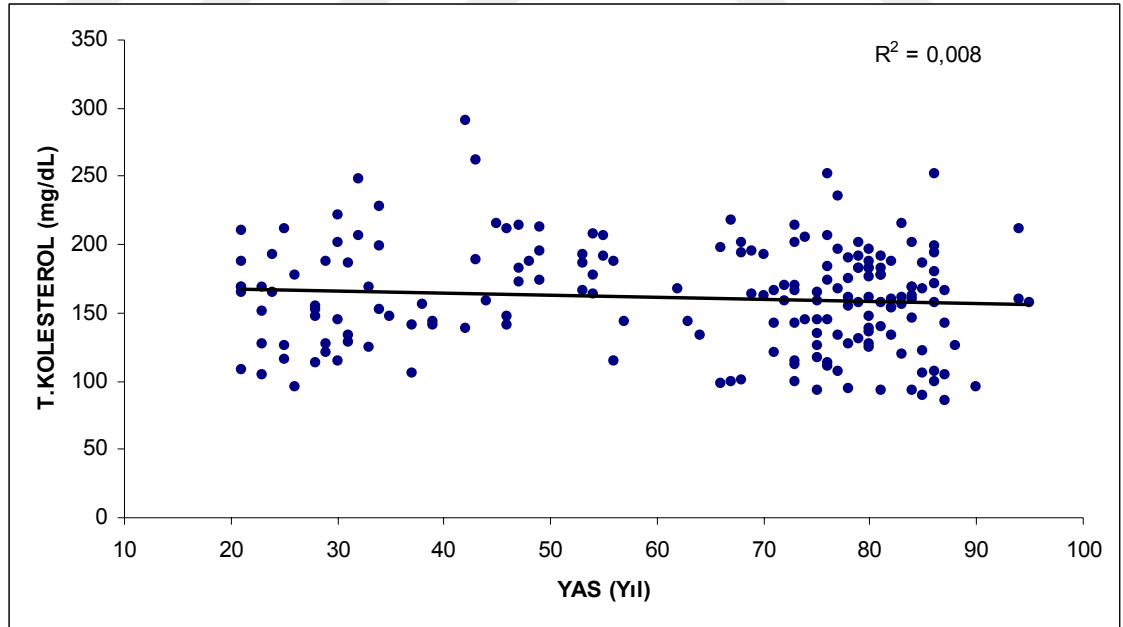
Değişkenler	Grup 1 (20-44 yaş)	Grup 2 (45-64 yaş)	Grup 3 (65-95 yaş)
Erkek, n (%)	20 (40.8)	9 (36.0)	38 (33.6)
Kadın, n (%)	29 (59.2)	16 (64.0)	75 (66.4)
Ortalama yaş, yıl	30.12 ± 6.6	52 ± 5.6	78.94 ± 6.2
VKİ, kg/m ²	26.2 ± 5.6	24.7 ± 5.1*	27.5 ± 5.0*
Sigara içimi, adet/gün	4,1 ± 7,2*	2,2 ± 5,6	0,1 ± 0,9*
Glukoz mg/dl	70,6 ± 12,1*	83,3 ± 18,7	91,0 ± 33,0*
Total_Kolesterol mg/dl	162,9 ± 42,8	177,3 ± 28,2*	157,2 ± 37,3*
HDL_Kolesterol mg/dl	44,9 ± 10,2	45,9 ± 9,0	45,2 ± 11,7
LDL_Kolesterol mg/dl	94,4 ± 35,6	107,8 ± 24,2*	91,4 ± 29,6*
VLDL_Kolesterol mg/dl	23,1 ± 16,4	23,6 ± 9,2	20,5 ± 9,7
Trigliserid mg/dl	115,5 ± 82,1	117,8 ± 46,1	101,8 ± 48,9
Bazal PON1 aktivitesi U/L	59,9 ± 35,7	46,4 ± 32,0	55,9 ± 36,1
PON_NaCl aktivitesi U/L	127,6 ± 96,1	93,7 ± 73,4	105,8 ± 85,8
PON tuzla stimülasyon oranı (%)	130,7 ± 185,2	139,2 ± 209,8	98,4 ± 133,4
Arilesteraz aktivitesi U/L	42,1 ± 33,4	35,7 ± 36,8	37,8 ± 37,7

* İstatistiksel olarak anlamlı değişiklik $p < 0.05$

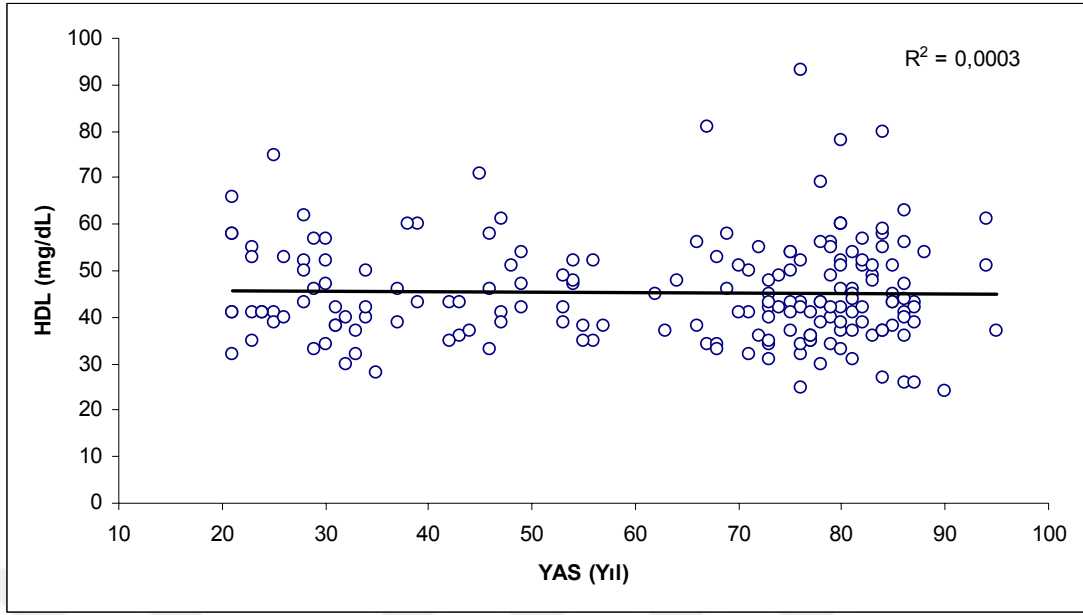
Değerler ortalama ± standard sapma olarak verilmiştir.

Tablo 4.2. Sigara içen ve içmeyenlerin lipid parametreleri, paraoksonaz ve arilesteraz aktiviteleri.

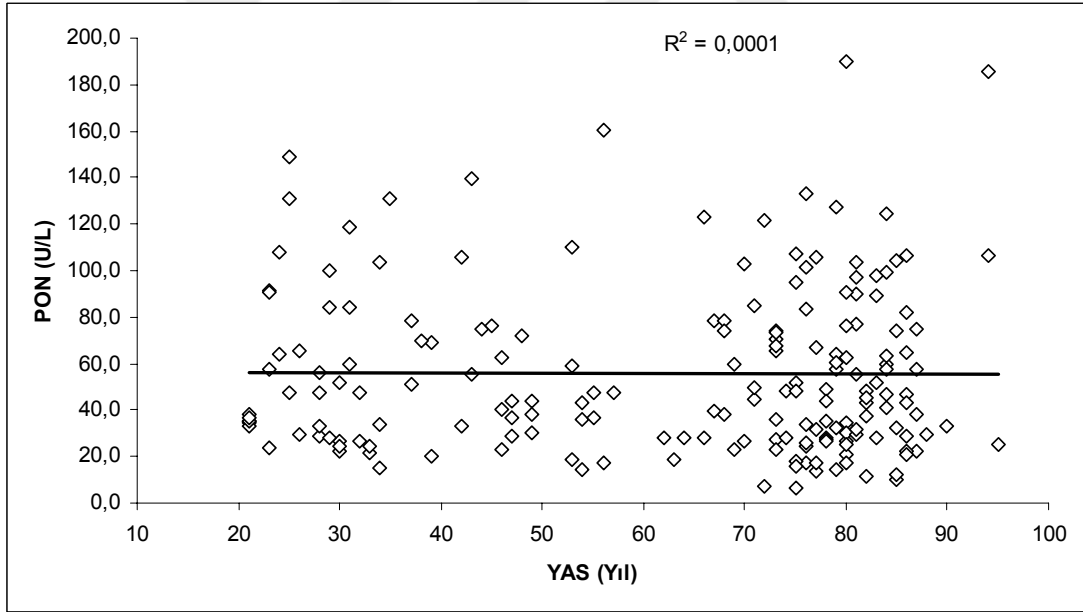
Değişkenler	Sigara içmeyen (n=165)	Sigara içen (n=22)
PON (U/L)	54,4 ± 34,8	65,1 ± 40,3
ARE (U/L)	37,4 ± 36,3	48,0 ± 36,6
Total_Kolesterol mg/dl	160,4 ± 38,9	168,2 ± 32,2
HDL_Kolesterol mg/dl	45,5 ± 11,3	43,4 ± 7,6
LDL_Kolesterol mg/dl	93,4 ± 30,6	102,2 ± 33,7
VLDL_Kolesterol mg/dl	21,6 ± 11,6	21,7 ± 13,1
Trigliserid mg/dl	107,4 ± 58,6	108,5 ± 65,2



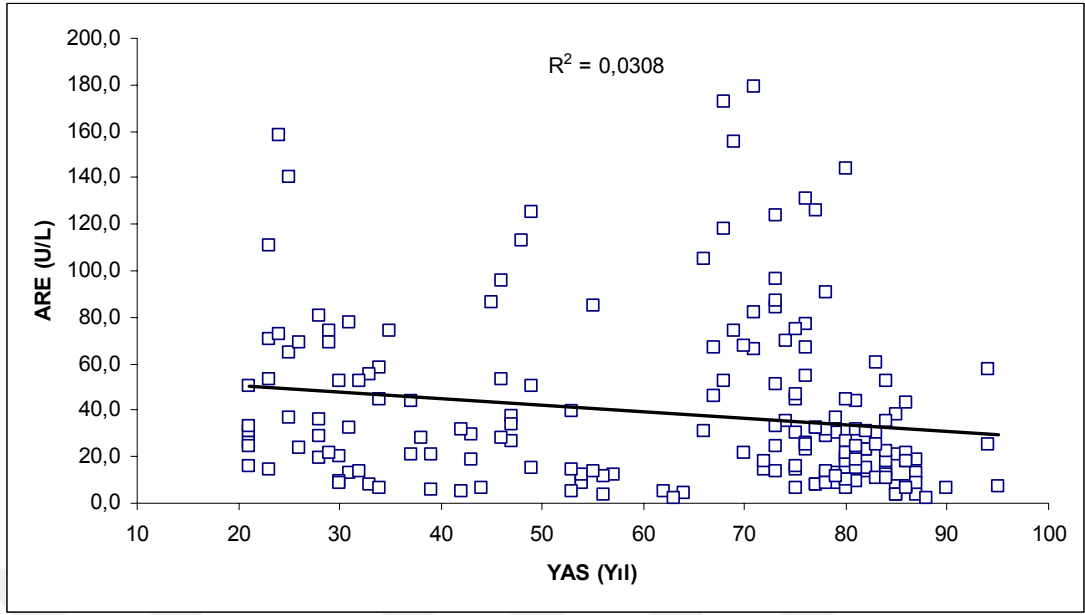
Şekil 4.1. Serum total kolesterol seviyelerinin yaşa bağlı değişimi



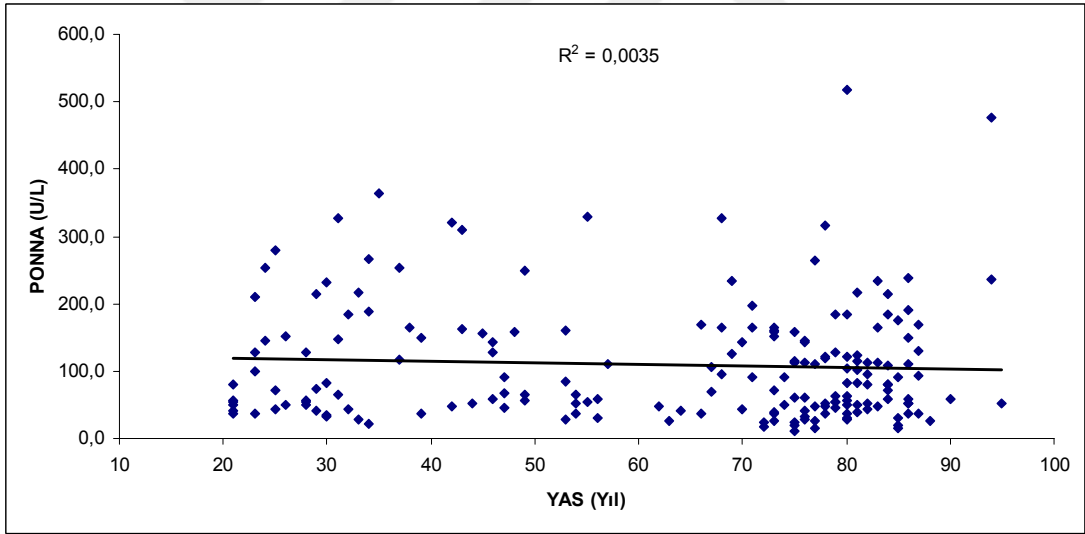
Şekil 4.2. Serum HDL kolesterol seviyelerinin yaşa bağlı değişimi



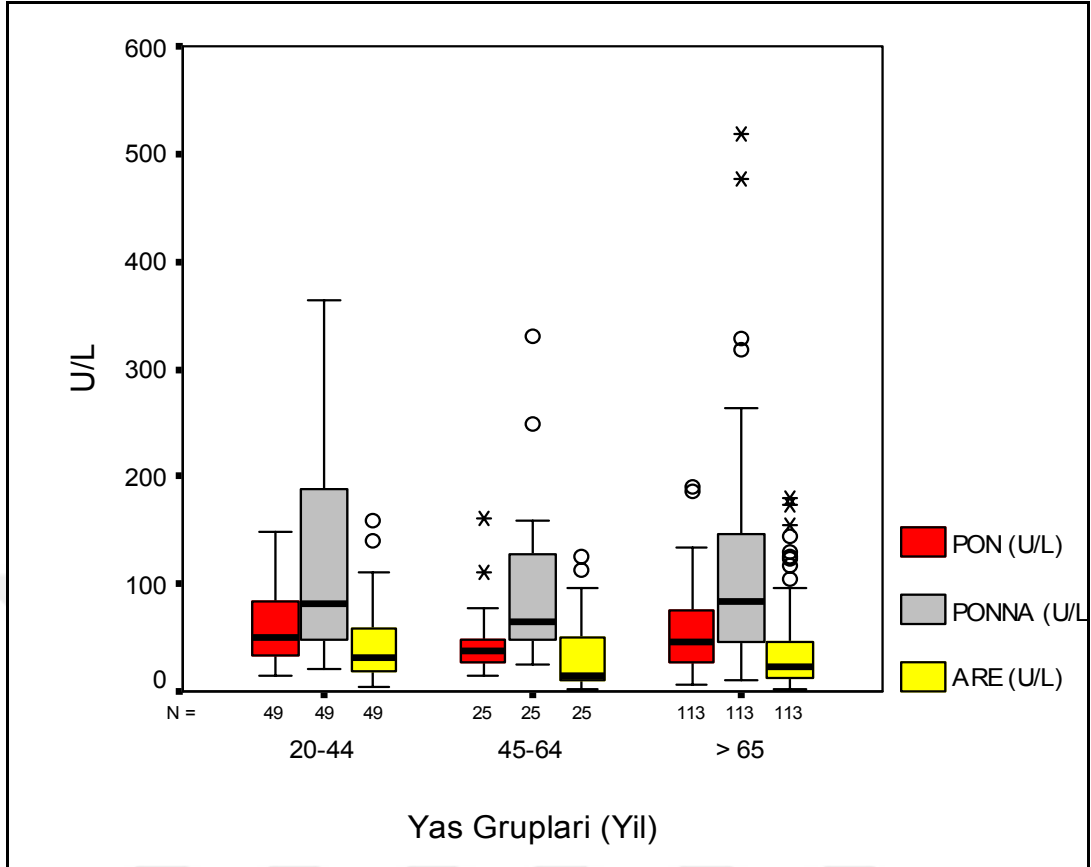
Şekil 4.3. Serum paraoksonaz aktivitesinin yaşa bağlı değişimi



Şekil 4.4. Serum arilesteraz aktivitesinin yaşa bağlı değişimi



Şekil 4.5. 1 M NaCl varlığında paraoksonaz aktivitesinin yaşa bağlı değişimi



Şekil 4.6. Farklı yaş gruplarında paraoksonaz, 1 M tuzla uyarılmış paraoksonaz ve arilesteraz aktivitelerinin dağılımı (n1=49, n2=25, n3=113).

PON1 aktivitesi paraokson (paraoksonaz aktivitesi) ve arilesterazın (arilesteraz aktivitesi) hidrolizi sonucunda açığa çıkan ürünlerin spektrofotometrik olarak ölçülmesiyle hesaplanmıştır. 1 M NaCl varlığında paraoksonaz aktivitesinin arilesteraz aktivitesine oranı (R) hesaplanarak bireylerin fenotip tayinleri yapılmıştır. Buna göre paraoksonaz aktivitesinin arilesteraz aktivitesine oranı homozigot A fenotipinde $R=1,73\pm0.46$, heterozigot AB fenotipinde $R=4,38\pm0.82$ ve homozigot B fenotipinde ise $R=9,04\pm1.03$ olarak tespit edilmiştir. Genel olarak tüm populasyonda AA, AB ve BB fenotiplerin görülme sıklığı sırasıyla %40.6, %46.0 ve %13.4 olarak bulunmuştur. Gruplar arasındaki fenotiplerin görülme sıklığı tablo 4.3'de verilmiştir. AA, AB ve BB fenotipe sahip bireylerin ortalama yaşları sırasıyla 54.7 ± 2.5 , 66.9 ± 2.3 ve 71.8 ± 4.1 olarak bulunmuştur.

Fenotipler arasında paraoksonaz aktiviteleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. Buna rağmen arilesteraz aktiviteleri AA fenotipinde AB ve BB fenotipine oranla daha yüksek bulunmuştur ($p<0.001$).

Tablo 4.3. Üç farklı PON1 polimorfizminin gruplar arasında dağılımı

Fenotip	Grup1 (20-44 yaş) n (%)	Grup2 (45-64 yaş) n (%)	Grup3 (66-95 yaş) n (%)
AA	23 (46,9)	10 (40,0)	43 (38,1)
AB	20 (40,8)	10 (40,0)	56 (49,6)
BB	6 (12,2)	5 (20,0)	14 (12,4)

$$r = \frac{\text{1 M NaCl varlığında PON aktivitesi}}{\text{Ariesteraz aktivitesi}}$$

5. TARTIŞMA

Yaşlanmaya bağlı olarak ateroskleroz ve ilişkili patolojilerde artış olmaktadır (80,89). Aterosklerotik patolojilerin başında kardiyovasküler hastalıklar gelir. Yaşlanma ile kardiyovasküler hastalıkların görülme insidansı artmaktadır. Kardiyovasküler hastalıklar endüstrileşmiş ülkelerde başlıca mortalite ve morbidite nedenidir. Kalp ve beyin gibi yaşamsal organları besleyen damarlarda aterosklerotik lezyonlar sonucu gelişen bu hastalıklar, 2005 yılında yayınlanan Avrupa kardiyovasküler hastalık istatistiklerine göre Avrupa'daki ölümlerin yaklaşık yarısının sebebinin oluşturmaktadır. Kardiyovasküler hastalıklardaki artışın yaşlanma ile birlikte artan LDL ve HDL oksidasyonuna bağlı olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (89,93).

HDL'nin anti-aterojenik özelliklere sahip olduğu ve ateroskleroz gelişimi ile ters bir korelasyon gösterdiği uzun yıllardır bilinmektedir. Serum total kolesterol ve düşük yoğunluklu lipoprotein düzeylerinin yüksek; buna karşılık HDL düzeylerinin düşük olması, aterosklerotik kalp hastalığı için risk faktörü olarak değerlendirilmektedir. Framingham çalışması ve diğer büyük ölçekli çalışmalardan elde edilen bulgular, HDL kolesterolün neden olduğu risk artışının, total kolesterol ve LDL kolesterolden bağımsız olduğunu göstermiştir. Başlangıçta HDL'nin "ters-kolesterol transportu" sistemindeki rolü üzerinde yoğunlaşıldı. Ancak HDL'nin aterosklerozdaki koruyucu rolü, ters kolesterol taşıması ile sınırlı değildir. HDL aynı zamanda nitrik oksit gibi bazı damar genişletici moleküllerin sentezini artırır, inflamasyonu ve tromboz oluşumunu önleyici etki gösterir, adezyon moleküllerinin sentezini azaltır ve endotel tamirini uyarır (47). HDL'nin bir başka önemli etkisi ise, aterosklerozun başlangıç ve gelişiminden sorumlu tutulan LDL'deki oksidatif değişimleri önlemesidir. HDL'nin antioksidan etkisinin kısmen HDL ile ilişkili enzimlere bağlı olabileceği düşünülmekte, özellikle paraoksonaz (PON) ve platelet aktive edici faktör asetilhidrolaz (PAFAH) enzimleri üzerinde durulmaktadır (82). HDL'nin yaşlanmaya bağlı olarak antiaterojenik aktivitesindeki azalmanın da bu duruma katkıda bulunduğu düşünülmektedir (89).

PON1'in büyük bir kısmı apo AI içeren HDL ile taşınır. Apo J veya klusterin ile birliktelik gösteren HDL'nin bir alt tipi de PON1 taşımaktadır (96). PON1, HDL üzerinde yer alan apo AI'e bağlanır.

PON1 HDL kolesterolün aterosklerozdan koruyucu rolüne çok önemli katkıda bulunmaktadır. PON1 HDL'nin antioksidan aktivitesinden en çok sorumlu tutulan faktördür (92). PON1 aktivitesi aterosklerozla ilişkili kardiyovasküler hastalıklar, diyabet ve kronik böbrek yetmezliği gibi patolojilerde azalmaktadır (104,136). Bu patolojilerin LDL ve HDL'nin artmış oksidasyonu ile birlikte olduğu bilinmektedir. Bu nedenle PON1'in antioksidan etkisinde azalma LDL ve HDL'nin okside olmasını etkilemektedir. PON1, bakır ve diğer serbest radikal üreticilerinin oluşturduğu oksidatif hasara karşı LDL ve HDL kolesterolü koruyarak aterosklerotik süreci engellemektedir. Bu koruma PON'un bazı aktif fosfolipidleri ve lipid peroksit ürünlerini hidrolize etmesi ile gerçekleşir.

Yaşa bağlı ateroskleroz ile ilişkili patolojilerin artışında PON1 aktivitesinin azalmasının rolü olup olmadığını araştırmak için bu çalışma yapıldı.

Çalışmada bilinen hiçbir kronik hastalığı olmayan bireyler kullanılarak yaşam süresinin doğrudan PON1 aktivitesine etkisi incelenmiştir. PON1 aktivitesi akut faz cevabında azaldığı için akut infeksiyöz hastalığı olanlar çalışma dışında tutulmuştur.

Yaşa bağlı ateroskleroz ve ilişkili hastalıklarda artış olmasına rağmen HDL kolesterol düzeylerinde yaşa bağlı değişim bildirilmemiştir (158). Bizim yaptığımız çalışmada da benzer şekilde HDL kolesterol düzeylerinde yaşa bağlı değişim gözlenmedi.

PON1 aktivitesinde cinsiyete ve yaşa bağlı istatistiksel olarak anlamlı bir değişim bulunmadı. Bu sonuç geçmişte yapılan diğer çalışmalarla da uyumludur (151,155,200). Ancak yaşa bağlı PON1 aktivitesinde düşüş olduğunu gösteren çalışmalar ile uyumsuzluk göstermektedir (157,158). Bu çalışmalardan Seres ve ark.nın çalışmasında total kolesterol düzeyi yaşlı grupta istatistiksel olarak daha yüksek bulunmuştur. Çalışmalar arasındaki bu

farklılık çalışmaya dahil edilen bireylerin seçim kriterlerinin farklı olması veya bireyler arasındaki genetik farklılıklardan kaynaklanabilir.

ARE aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamasına rağmen yaşa bağlı bir azalma paterni gözlenmiştir (şekil 4.4).

Bizim çalışmamızda yaşa bağlı PON1 aktivitesi değişmeyip ARE aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte düşme paterni izlenmesine rağmen, Khalil ve ark.nın yaptığı çalışmada PON1 aktivitesi düşük ARE aktivitesi değişmemiş bulunmuştur (158). Bu çalışma ile bizim çalışmamız arasındaki farklılık her iki çalışmada kullanılan bireylerin PON1 polimorfizm farklılığına bağlı olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca Khalil ve ark.nın çalışmasında sigara içenlerin oranı bizim çalışmamızdakilerin yaklaşık 3 katıdır. Bu durumun da bu çalışma ile bizim çalışmamız arasındaki farklılığa katkısı olabilir.

Polimorfizmlerin toplam görülme sıklığı daha önceki literatürler ile uyumlu bulunmuştur (157,158). Bizim çalışmamızda ve diğer çalışmalarda (157,158) polimorfizmlerin görülme sıklığı en çoktan en aza doğru sırasıyla AA, AB ve BB şeklindedir. Seres ve ark.nın çalışması ile bizim çalışmamız arasında sadece orta yaş grubundaki AB fenotip sıklığında belirgin fark olup diğerlerinde belirgin fark yoktur (Tablo 4.3).

Çalışmamızda PON1 aktivitesinde yaşa bağlı bir değişim bulunamaması çalışmada kullanılan yaşlı gruptaki bireylerin PON1 aktivitesindeki düşüşe karşı kendilerini koruyabilmiş olmalarına bağlı olabilir. Bu durumun da gösterdiği gibi yaşa bağlı biyokimyasal parametrelerin incelenmesinde kesitsel çalışmalar çok uygun değildir. Çünkü ileri yaşa ulaşabilen bireyler zaten seleksiyonla bu yaşlara kadar yaşayabilmiş olabilirler. PON1 aktivitesindeki yaşa bağlı değişimler ile ilgili literatürde yer alan çalışmaların tamamı ve bizim çalışmamız kesitsel çalışma olduğundan, longitudinal çalışma sonuçları görülene kadar PON1 aktivitesindeki yaşa bağlı değişimler ile ilgili kesin bir sonuca ulaşılması olanaklı görülmemektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak PON yaşılanma ve yaşa bağlı ortaya çıkan patolojilerde önemli bir role sahiptir. Ancak yaptığımız çalışmada yaşa bağlı PON1 aktivitesinde azalma olmaması yaşılanma sürecine PON1'in bir katkısı olmadığını göstermektedir. Arada fark bulunmamasının sebebi bireylerin ileri yaşlara erişebilmelerinde PON1 düzeylerinin zaten yüksek olmasının katkısının da olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır.

Bu nedenle yaşa bağlı PON1 aktivitesindeki değişimlerin incelenmesi için kesitsel çalışmalar yerine uzun süreli prospektif çalışmalar yapıldıktan sonra sonuca varılmasının daha sağlıklı olacağı değerlendirilmektedir.

Bu nedenle dünyada halen devam etmekte olan büyük ölçekli longitudinal yaşılanma çalışmalarından elde edilen kan örnekleri bu tür çalışmalar için kullanılabilir.

7. KAYNAKLAR

1. Juretic, D, Tadijanovic, M, Rekic, B, Simean-Rudolf, V, Reiner, E, Baricic, M. (2001) Serum paraoxonase activities in hemodialyzed uremic patients: cohort study. Clin Sci. 42, 146-150.
2. Li, W.F, Costa, L.G, Furlong, C.E. (1993) Serum paraoxonase status: a major factor in determining resistance to organophosphates. J Toxicol and Environ Health. 40, 337-346.
3. Aldridge WN (1953a) Serum esterases I. Two types of esterase (A and B) hydrolysing p-nitrophenyl acetate, propionate and butyrate and a method for their determination. Biochem J 53: 110–117
4. Mazur A. An enzyme in animal tissue capable of hydrolyzing the phosphorus-fluorine bond of alkyl fluorophosphates. J.Biol.Chem. 1946; 164: 271-89.
5. Aldridge WN (1953b) Serum esterases II. An enzyme hydrolysing diethyl p-nitrophenyl acetate (E600) and its identity with the A-esterase of mammalian sera. Biochem J 53:117–124
6. Uriel, A. (1961) Characterisation des cholinesterases et d'autres esterases carboxylique apres electrophorese et immunoelectrophorese en gleose I: applications a l'etude des esterases du serum humain normal. Ann. Inst. Pasteur 101, 104.
7. Geldmacher V.,MallinckrodtM. and Diepgen T. L. (1988) The human paraoxonase polymorphism and specificity. Toxicol. Environ. Chem. 18, 79–196.
8. Mackness M. I. and Walker C. H. (1988) Multiple forms of sheep serum A-esterase activity associated with the high-density lipoprotein. Biochem. J. 250, 539–545.
9. Mackness M. I., Mackness B., Durrington P. N., Connelly P.W. and Hegele R. A. (1996) Paraoxonase: biochemistry, genetics and relationship to plasma lipoproteins. Curr. Opin. Lipidol. 7, 69–76.

10. Sorenson R. C., Primo-Parmo S. L., Kuo C.-L., Adkins S., Lockridge O. and La Du B. N. (1995b) Reconsideration of the catalytic center and mechanism of mammalian paraoxonase/arylesterase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 7187–7191.
11. Mackness M. I., Arrol S. and Durrington P. N. (1991b) Paraoxonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein. *FEBS Lett.* 286, 152–154.
12. Hong-Liang L, De-Pei L, Chihj-Chuan L. Paraoxonase gene polymorphisms, oxidative stress and diseases. *J Mol Med* 2003; 81:766-79.
13. Cathcart MK, McNally AK, Chisolm GM. Lipoxygenase-mediated transformation of human low density lipoprotein to oxidized and cytotoxic complex. *J Lipid Res* 1991. 32: 63-70.
14. Blatter Garin, M.-C., James, R. W., Dussoix, P. et al. (1997) Paraoxonase polymorphism Met-Leu54 is associated with modified serum concentrations of the enzyme. A possible link between the paraoxonase gene and increased risk of cardiovascular disease in diabetes. *J. Clin. Invest.* 99, 62–66
15. Leviev, I., Negro, F. and James, R.W. (1997) Two alleles of the human paraoxonase gene produce different amounts of mRNA: an explanation for differences in serum concentrations of paraoxonase associated with the (Leu-Met54) polymorphism. *Arterioscler., Thromb., Vasc. Biol.* 17, 3935–3939
16. Leviev, I. and James, R. W. (2000) Promoter polymorphisms of the human paraoxonase PON1 gene and serum paraoxonase activities and concentrations. *Arterioscler., Thromb., Vasc. Biol.* 20, 516–521
17. Brophy, V. H., Jampsa, R. L., Clendenning, J. B., McKinstry, L. A., Jarvik, G. P. and Furlong, C. E. (2001) Effects of 5' regulatory-region polymorphisms on paraoxonase-gene (PON1) expression. *Am. J. Hum. Genet.* 68, 1428–1436

18. Leviev, I., Deakin, S. and James, R. W. (2001) Decreased stability of the M54 isoform of paraoxonase as a contributory factor to variations in human serum paraoxonase concentrations. *J. Lipid Res.* 42, 528–535
19. Harel, M. Aharoni, A. Gaidukov, L. Brumshtein, B. Khersonsky, O. Meged, R. Dvir, H. Ravelli, R. B. McCarthy, A. Toker, L. Silman, I. Sussman, J. L. Tawfik, D. S. Structure and evolution of the serum paraoxonase family of detoxifying and anti-atherosclerotic enzymes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11:412– 419. 2004.
20. Deakin, S., James, R.W. Genetic and environmental factors modulating serum concentrations and activities of the antioxidant enzyme paraoxonase-1. *Clinical Science* (2004) 107, 435–447
21. Costa, L. G., Cole, T. B., Jarvik, G. P. and Furlong, C. E. (2003) Functional genomic of the paraoxonase (PON1) polymorphisms: effects on pesticide sensitivity, cardiovascular disease, and drug metabolism. *Annu. Rev. Med.* 54, 371–392
22. Wheeler, J. G., Keavney, B. D., Watkins, H., Collins, R. and Danesh, J. (2004) Four paraoxonase gene polymorphisms in 11 212 cases of coronary heart disease and 12 786 controls: meta-analysis of 43 studies. *Lancet* 363, 689–695
23. Brophy, V. H., Hastings, M. D., Clendenning, J. B., Richter, R. J., Jarvik, G. P., Furlong, C. E. Polymorphisms in the human paraoxonase (PON1) promoter. *Pharmacogenetics* 11:77 – 84; 2001.
24. Suehiro, T., Nakamura, T., Inoue, M., Shiinoki, T., Ikeda, Y., Kumon, Y., Shindo, M., Tanaka, H., Hashimoto, K. A polymorphism upstream from the human paraoxonase (PON1) gene and its association with PON1 expression. *Atherosclerosis* 150:295–298. 2000.
25. Deakin, S., Leviev, I., Brulhart Meynet, M. C. and James, R. W. (2003) Paraoxonase-1 promoter haplotypes and serum paraoxonase: a predominant role in vivo for polymorphic position -107 implicating the transcription factor Sp1. *Biochem. J.* 372, 643–649

26. Gou'edard, C., Koum-Besson, N., Barouki, R. and Morel, Y. (2003) Opposite regulation of the human paraoxonase-1 gene PON-1 by fenofibrate and statins. *Mol. Pharmacol.* 63, 945–956
27. Deakin, S., Leviev, I., Guernier, S. and James, R. W. (2003) Simvastatin modulates expression of the PON1 gene and increases serum paraoxonase: a role for sterol regulatory element-binding protein-2. *Arterioscler., Thromb., Vasc. Biol.* 23, 2083–2089
28. Kumon, Y., Suehiro, T., Ikeda, Y. and Hashimoto, K. (2003) Human paraoxonase-1 gene expression by HepG2 cells is downregulated by interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α , but is upregulated by interleukin-6. *Life Sci.* 73, 2807–2815
29. Voetsch, B., Benke, K. S., Panhuysen, C. I., Damasceno, B. P. and Loscalzo, J. (2004) The combined effect of paraoxonase promoter and coding region polymorphisms on the risk of arterial ischemic stroke among young adults. *Arch. Neurol.* 61, 351–356
30. Leviev, I., Kalix, B., Brulhart Meynet, M.-C. and James, R. W. (2001) The paraoxonase PON1 promoter polymorphism C(–107)T is associated with increased serum glucose concentrations in non-diabetic patients. *Diabetologia* 44, 1177–1183
31. Leviev, I., Poirier, O., Nicaud, V., Evans, A., Kee, F., Arveiler, D., Morrisson, C., Cambien, F., James, R. W. High expressor paraoxonase PON1 gene promoter polymorphisms are associated with reduced risk of vascular disease in younger coronary patients. *Atherosclerosis* 16:463– 467, 2002.
32. James, R. W., Leviev, I., Ruiz, J., Passa, P., Froguel, P. And Garin, M.-C. (2000) The promoter polymorphism T(–107)C of the paraoxonase PON1 gene is a risk factor for coronary heart disease in type 2 patients. *Diabetes* 49, 1390–1393
33. Jarvik GP, Hatsukami TS, Carlson C, Richter RJ, Jampsa R, Brophy VH, Margolin S, Rieder M, Nickerson D, Schellenberg GD, Heagerty PJ, Furlong

CE. Paraoxonase activity, but not haplotype utilizing the linkage disequilibrium structure, predicts vascular disease. *Arterioscler Thromb Vas Biol.* 2003. 23: 1465–1471

34. Campo, S., Sardo, M. A., Trimarchi, G. et al. (2004) The paraoxonase promoter polymorphism (–107)T→C is not associated with carotid intima-media thickness in Sicilian hypercholesterolemic patients. *Clin. Biochem.* 37, 388–394

35. Balci Ekmekçi Ö, Donma O, Ekmekçi H. Paraoxonase. *Cerrahpaşa J Med* 2004. 35: 78-82.

36. Mackness B, Durrington PN, Mackness MI. Human serum Paraoxonase. *Gen Pharm* 1998. 3: 329-36.

37. Khersonsky O, Tawfik DS. Structure-reactivity studies of serum paraoxonase PON-1 suggest that its native activity is lactonase. *Biochemistry* 2005. 44:6371-82.

38. Draganov DI, Stetson PL, Watson CE, Billecke SS, La Du BN. Rabbit serum paraoxonase 3 (PON3) is a high density lipoprotein- associated lactonase and protects low density lipoprotein against oxidation. *J Biol Chem* 2000. 275: 4435-42.

39. Primo-Parmo, S. L., Sorenson, R. C., Teiber, J., La Du, B. N. The human serum paraoxonase/arylesterase gene (PON1) is one member of a multigene family. *Genomics* 33:498–507. 1996.

40. Ng, C. J., Wadleigh, D. J., Gangopadhyay, A., Hama, S., Grijalva, V. R., Navab, M., Fogelman, A. M., Reddy, S. T. Paraoxonase-2 is a ubiquitously expressed protein with antioxidant properties and is capable of preventing cell-mediated oxidative modification of low density lipoprotein. *J. Biol. Chem.* 276:44444–44449. 2001.

41. Chen, Q., Reis, S. E., Kammerer, C. M., McNamara, D. M., Holubkov, R., Sharaf, B. L., Sopko, G., Pauly, D. F., Merz, C. N., Kamboh, M. I. Association between the severity of angiographic coronary artery disease and paraoxonase gene polymorphisms in the National Heart, Lung, and Blood

Institute-sponsored Women's Ischemia Syndrome Evaluation (WISE) study. *Am. J. Hum. Genet.* 72:13– 22. 2003.

42. Shi, J.; Zhang, S.; Tang, M.; Liu, X.; Li, T.; Han, H.; Wang, Y.; Guo, Y.; Zhao, J.; Li, H.; Ma, C. Possible association between Cys311Ser polymorphism of paraoxonase 2 gene and late-onset Alzheimer's disease in Chinese. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 120: 201– 204; 2004.

43; Wang, X. Y.; Xue, Y. M.; Wen, S. J.; Zhang, N. L.; Ji, Z.; Pan, S. Y. The association of paraoxonase 2 gene C311S variant with ischemic stroke in Chinese type 2 diabetes mellitus patients. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 20:215– 219; 2003.

44; Pan, J. P.; Lai, S. T.; Chiang, S. C.; Chou, S. C.; Chiang, A. N. The risk of coronary artery disease in population of Taiwan is associated with Cys–Ser 311 polymorphism of human paraoxonase (PON)-2 gene. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi (Taipei)* 65:415–421; 2002.

45; Kao, Y.; Donaghue, K. C.; Chan, A.; Bennetts, B. H.; Knight, J.; Silink, M. Paraoxonase gene cluster is a genetic marker for early microvascular complications in type 1 diabetes. *Diabet. Med.* 19:212– 215; 2002.

46; Janka, Z.; Juhasz, A.; Rimanoczy, A. A.; Boda, K.; Marki-Zay, J.; Kalman, J. Codon 311 (CysYSer) polymorphism of paraoxonase-2 gene is associated with apolipoprotein E4 allele in both Alzheimer's and vascular dementias. *Mol. Psychiatry.* 7:110– 112; 2002.

47; Sanghera, D. K.; Aston, C. E.; Saha, N.; Kamboh, M. I. DNA polymorphisms in two paraoxonase genes (PON1 and PON2) are associated with the risk of coronary heart disease. *Am. J. Hum. Genet.* 62:36–44; 1998.

48; Martinelli, N.; Girelli, D.; Olivieri, O.; Stranieri, C.; Trabetti, E.; Pizzolo, F.; Friso, S.; Tenuti, I.; Cheng, S.; Grow, M. A.; Pignatti, P. F.; Corrocher, R. Interaction between smoking and PON2 Ser311Cys polymorphism as a determinant of the risk of myocardial infarction. *Eur. J. Clin. Invest.* 34:14–20; 2004.

- 49; Yamada, Y.; Ando, F.; Niino, N.; Miki, T.; Shimokata, H. Association of polymorphisms of paraoxonase 1 and 2 genes, alone or in combination, with bone mineral density in community-dwelling Japanese. *J. Hum. Genet.* 48:469–475; 2003.
- 50; Rosenblat, M.; Hayek, T.; Hussein, K.; Aviram, M. Decreased macrophage paraoxonase 2 expression in patients with hypercholesterolemia is the result of their increased cellular cholesterol content: effect of atorvastatin therapy. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24:175– 180; 2004.
- 51; Reddy, S. T.; Wadleigh, D. J.; Grijalva, V.; Ng, C.; Hama, S.; Gangopadhyay, A.; Shih, D. M.; Lusi, A. J.; Navab, M.; Fogelman, A. M. Human paraoxonase-3 is an HDL-associated enzyme with biological activity similar to paraoxonase-1 protein but is not regulated by oxidized lipids. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21:542–547; 2001.
- 52; Mackness, B.; Durrington, P. N.; Mackness, M. I. The paraoxonase gene family and coronary heart disease. *Curr. Opin. Lipidol.* 13:357– 362; 2002.
- 53; Li, H. L.; Liu, D. P.; Liang, C. C. Paraoxonase gene polymorphisms, oxidative stress, and diseases. *J. Mol. Med.* 81:766– 779; 2003.
- 54; Humbert, R.; Adler, D. A.; Distech, C. M.; Hassett, C.; Omiecinski, C. J.; Furlong, C. E. The molecular basis of the human serum paraoxonase activity polymorphism. *Nat. Genet.* 3:73– 76; 1993.
- 55; Adkins, S.; Gan, K. N.; Mody, M.; La Du, B. N. Molecular basis for the polymorphic forms of human serum paraoxonase/arylesterase: glutamine or arginine at position 191, for the respective A or B allozymes. *Am. J. Hum. Genet.* 52:598– 608; 1993.
- 56; Feingold, K. R.; Memon, R. A.; Moser, A. H.; Grunfeld, C. Paraoxonase activity in the serum and hepatic mRNA levels decrease during the acute phase response. *Atherosclerosis* 139: 307– 315; 1998.
- 57; Van Lenten, B. J.; Wagner, A. C.; Nayak, D. P.; Hama, S.; Navab, M.; Fogelman, A. M. High-density lipoprotein loses its anti-inflammatory

properties during acute influenza A infection. *Circulation* 103:2283–2288; 2001.

58; Cabana, V. G.; Reardon, C. A.; Feng, N.; Neath, S.; Lukens, J.; Getz, G. S. Serum paraoxonase: effect of the apolipoprotein composition of HDL and the acute phase response. *J. Lipid Res.* 44:780–792; 2003.

59; Martoglio, B.; Dobberstein, B. Signal sequences: more than just greasy peptides. *Trends Cell Biol.* 8:41041–41045; 1998.

60; Hassett, C.; Richter, R. J.; Humbert, R.; Chapline, C.; Crabb, J. J.; Omiecinski, C. J.; Furlong, C. Characterisation of cDNA clones encoding rabbit and human serum paraoxonase: the mature protein retains its signal sequence. *Biochemistry* 30:10141– 10149; 1991.

61; Deakin, S.; Leviev, I.; Gomaraschi, M.; Calabresi, L.; Franceschini, G.; James, R. W. Enzymatically active paraoxonase-1 is located at the external membrane of producing cells and released by a high affinity, saturable, desorption mechanism. *J. Biol. Chem.* 277:4301– 4308; 2002.

62; Acton, S.; Rigotti, A.; Landschulz, K. T.; Xu, S.; Hobbs, H. H.; Krieger, M. Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science* 271:518– 520; 1996.

63; Krieger, M. Charting the fate of the good cholesterol: identification and characterization of the high-density lipoprotein receptor SR-BI. *Annu. Rev. Biochem.* 68:523– 558; 1999.

64; Sorenson, R. C.; Bisgaier, C. L.; Aviram, M.; Hsu, C.; Billecke, S.; La Du, B. N. Human serum paraoxonase/arylesterase's retained hydrophobic N-terminal leader sequence associates with HDLs by binding phospholipids: apolipoprotein A-I stabilizes activity. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19:2214– 2225; 1999.

65; James, R. W.; Blatter Garin, M. C.; Calabresi, L.; Miccoli, R.; von Eckardstein, A.; Tilly-Kiesi, M.; Taskinen, M.-R.; Assmann, G.; Franceschini, G. Modulated serum activities and concentrations of paraoxonase in high density lipoprotein deficiency states. *Atherosclerosis* 139:77– 82; 1998.

66; Oda, M. N.; Bielicki, J. K.; Berger, T.; Forte, T. M. Cysteine substitutions in apolipoprotein A-I primary structure modulate paraoxonase activity. *Biochemistry* 40:1710– 1718; 2001.

67; Mackness, B, Mackness, M.I, Arrol, S, Turkei, W, Durrington, P.N. (1998) The effect of the human serum paraoxonase 55 and 192 genetic polymorphisms on the protection by high density lipoprotein against low density lipoprotein oxidative modification. *FEBS Letters*, 423, 57-60.

68; La Du BN (1992) Human serum paraoxonase/arylesterase. In: Kalow W (ed) *Genetic factors influencing the metabolism of foreign compounds* (International encyclopedia of pharmacology and therapeutics). Pergamon Press, New York, pp 51–91

69; Broomfield CA, Ford KW (1991) Hydrolysis of nerve gases by plasma enzymes. *Proceedings of the 3rd International Meeting on Cholinesterases*, La Grande-Motte, p 161

70; Davies HG, Richter RJ, Keifer M, Broomfield CA, Sowalla J, Furlong CE (1996) The effect of the human serum paraoxonase polymorphism is reversed with diazoxon, soman and sarin. *Nature Genet* 14:334–336

71; Billecke S, Draganov D, Counsell R, Stetson P, Watson C, Hsu C, La Du BN (2000) Human serum paraoxonase (PON1) isozymes Q and R hydrolyze lactones and cyclic carbonate esters. *Drug Metab Dispos* 28:1335–1342

72; Jakubowski H (2000) Calcium-dependent human serum homocysteine thiolactone hydrolase. A protective mechanism against protein N-homocysteinylation. *J Biol Chem* 275:3957–3962

73; Teiber, J. F.; Draganov, D. I.; La Du, B. N. Lactonase and lactonizing activities of human serum paraoxonase (PON1) and rabbit serum PON3. *Biochem. Pharmacol.* 66:887–896; 2003.

74; D. I. Draganov, B. N. La Du. Pharmacogenetics of paraoxonases: a brief review. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* (2004) 369 : 78–88

75; Rye KA, Clay MA, Barter PJ. Remodelling of high-density lipoproteins by plasma factors. *Atherosclerosis* 1999; 145: 227-238.

76; Maron DJ, Ridker PM, Pearson TA, Grundy SM. Dyslipidemia, other risk factors, and the prevention of coronary heart disease. Ch 38. In: Fuster V, Alexander RW, O'Rourke R. Hurst's The Heart 10th edn. McGraw-Hill Companies. USA 2001; 1131-60.

77; Chait A, Han CY, Oram JF, Heinecke JW. Lipoprotein-associated inflammatory proteins: markers or mediators of cardiovascular disease? J Lipid Res 2005; 46:389-403.

78; Mackness MI, Durrington PN, Mackness B. The role of paraoxonase 1 activity in cardiovascular disease: potential for therapeutic intervention. Am J Cardiovasc Drugs 2004; 4:211-7.

79; Deakin I, Edwards JE, Frye RL, Gensini GG, Gott VL Expression of human paraoxonase (PON1) during development. Pharmacogenetics. 2003 Jun;13(6):357-64.

80; Aviram, M.; Rosenblat, M.; Bisgaier, C. L.; Newton, R. S.; Primo-Parmo, S. L.; La Du, B. N. Paraoxonase inhibits high density lipoprotein (HDL) oxidation and preserves its functions: a possible peroxidative role for paraoxonase. J. Clin. Invest. 101:1581– 1590; 1998.

81; Watson, A. D.; Berliner, J. A.; Hama, S. Y.; La Du, B. N.; Faull, K. F.; Fogelman, A. M.; Navab, M. Protective effect of high density lipoprotein associated paraoxonase: inhibition of the biological activity of minimally oxidized low density lipoprotein. J. Clin. Invest. 96:2882–2891; 1995.

82; Rodrigo, L.; Mackness, B.; Durrington, P. N.; Hernandez, A.; Mackness, M. I. Hydrolysis of platelet-activating factor by human serum paraoxonase. Biochem. J. 354(Pt. 1):1– 7; 2001.

83; Rozenberg, O.; Shih, D. M.; Aviram, M. Human serum paraoxonase 1 decreases macrophage cholesterol biosynthesis: possible role for its phospholipase-A2-like activity and lysophosphatidylcholine formation. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 23:461– 467; 2003.

- 84; Heijmans BT, Westendorp RGJ, Lagaay AM, Knook DL, Kluft C, Slagboom PE. Common paraoxonase gene variants, mortality risk and fatal cardiovascular events in elderly subjects. *Atherosclerosis*, 2000; 149: 91-7.
- 85; Aviram M, Hardak E, Vaya J, Mahmood S, Milo S, Hoffman A, Billicke S, Draganov D, Rosenblat M. Human serum paraoxonases (PON1) Q and R selectively decrease lipid peroxides in human coronary and carotid atherosclerotic lesions. *Circulation* 2000; 101: 2510-17.
- 86; Heinecke JW. Eosinophil-dependent bromination in the pathogenesis of asthma. *J Clin Invest*, 2000; 105: 1331-2.
- 87; Shoji T, Nishizawa Y, Fukumoto M, Shimamura K, Kimura J, Kanda H, Emoto M, Kawagishi T, Morri H. Inverse relationship between circulating oxidized low density lipoprotein (OxLDL) and anti-oxidized LDL antibody levels in healthy subjects. *Atherosclerosis*, 2000; 148: 171-7.
- 88; Rousselot DB, Therond P, Beaudeau JL, Peynet J, Legrand A, Delatre J. High density lipoproteins and the oxidative hypothesis of atherosclerosis. *Clin Chem Lab Med* 1999; 37:939-49.
- 89; Mackness, M. I.; Arrol, S.; Abbott, C.; Durrington, P. N. Protection of low-density lipoprotein against oxidative modification by highdensity lipoprotein associated paraoxonase. *Atherosclerosis* 104:129– 135; 1993.
- 90; Aviram, M.; Billecke, S.; Sorenson, R.; Bisgaier, C.; Newton, R.; Rosenblat, M.; Erogul, J.; Hsu, C.; Dunlop, C.; La Du, B. Paraoxonase active site required for protection against LDL oxidation involves its free sulfhydryl group and is different from that required for its arylesterase/paraoxonase activities: selective action of human paraoxonase allozymes Q and R. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 18:1617– 1624; 1998.
- 91; Marathe GK, Zimmerman GA, McIntyre TM. Platelet-activating factor acetylhydrolase, and not paraoxonase-1, is the oxidized phospholipid hydrolase of high density lipoprotein particles. *J Biol Chem* 2003; 278:3937– 3947.

- 92; Durrington PN, Mackness B, Mackness MI. Paraoxonase and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21:473–480.
- 93; Watson AD, Navab SY, Hama A. Effect of platelet-activating factor-acetylhydrolase on the formation and action of minimally oxidized low density lipoprotein. *J Clin Invest* 1995; 95: 774-82.
- 94; Bøg-Hansen T. C., Krog H. H. and Back U. (1978) Plasma lipoprotein-associated arylesterase is induced by bacterial lipopolysaccharide. *FEBS Lett.* 93, 86-90.
- 95; Liao W. and Floreán C. H. (1993) Hyperlipidaemic response to endotoxin: part of the host defence mechanism. *Scand. J. Infect. Dis.* 25, 675–682.
- 96; Kelso, G. J., Stuart, W. D., Richter, R. J., Furlong, C. E., Jordan-Starck, T. C. and Harmony, J. A. K. (1994) Apolipoprotein J is associated with paraoxonase in human plasma. *Biochemistry* 33, 832–839
- 97; Blatter, M.-C., James, R. W., Messmer, S., Barja, F. And Pometta, D. (1993) Identification of a distinct human high-density lipoprotein subspecies defined by a lipoprotein-associated protein, K-45. Identity of K-45 with paraoxonase. *Eur. J. Biochem.* 211, 871–879
- 98; Bagdade, J. D., Buchanan, W. E., Kuusi, T. and Taskinen, M. R. (1990) Persistent abnormalities in lipoprotein composition in noninsulin-dependent diabetes after intensive insulin therapy. *Arteriosclerosis* 10, 232–23
- 99; Williams KJ, Tabas I. The response-to-retention hypothesis of early atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:551–61 88.
- 100; Parthasarathy S, Morales AJ, Murphy AA. Antioxidant: a new role for RU-486 and related compounds. *J Clin Invest* 1994;94:1990–5
- 101; Mackness, B.; Davies, G. K.; Turkie, W.; Lee, E.; Roberts, D. H.; 1312 M. Aviram and M. Rosenblat Mackness, M. I.; Roberts, C.; Durrington, P. N.; Mackness, M. I. Paraoxonase status in coronary heart disease: are activity and concentration more important than genotype? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21:1451– 1457; 2001.

- 102; Mackness, B.; Durrington, P. N.; McElduff, P.; Yarnell, J.; Azam, N.; Watt, M.; Mackness, M. Low paraoxonase activity predicts coronary events in the Caerphilly Prospective Study. *Circulation* 107:2775– 2779; 2003.
- 103; Mackness, M. I.; Harty, D.; Bhatanagar, D.; Wincocour, P. H.; Arrol, S.; Ishola, M.; Durrington, P. N. Serum paraoxonase activity in familial hypercholesterolemia and insulin-dependent diabetes mellitus. *Atherosclerosis* 86:193– 197; 1991.
- 104; Abbott, C. A.; Mackness, M. I.; Kumar, S.; Boulton, A. J.; Durrington, P. N. Serum paraoxonase activity, concentration, and phenotype distribution in diabetes mellitus and its relationship to serum lipids and lipoproteins. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 15:1812–1818; 1995.
- 105; Boemi, M.; Leviev, I.; Sirolla, C.; Pieri, C.; Marra, M.; James, R. W. Serum paraoxonase is reduced in type 1 diabetic patients compared to non-diabetic, first degree relatives: influence on the ability of HDL to protect LDL from oxidation. *Atherosclerosis* 155:229– 235; 2001.
- 106; Letellier, C.; Durou, M. R.; Jouanolle, A. M.; Le Gall, J. Y.; Poirier, J. Y.; Ruelland, A. Serum paraoxonase activity and paraoxonase gene polymorphism in type 2 diabetic patients with or without vascular complications. *Diabetes Metab.* 28:297–304; 2002.
- 107; Mackness, M. I.; Boullier, H.; Hennuyer, M.; Mackness, B.; Hall, M.; Tailleux, A.; Duriez, P.; Delfly, B.; Durrington, P. N.; Fruchart, J. C.; Duverager, N.; Cailloud, J. M.; Castro, G.; Bouiller, A. Paraoxonase activity is reduced by a proatherogenic diet in rabbits. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 269:232–236; 2000.
- 108; Garin, M. C.; James, R. W.; Dussoix, P.; Blanche, H.; Passa, P.; Froguel, P.; Ruiz, J. Paraoxonase polymorphism Met-Leu54 is associated with modified serum concentrations of the enzyme: a possible link between the paraoxonase gene and increased risk of cardiovascular disease in diabetes. *J. Clin. Invest.* 99:62–66; 1997.

- 109; Imai, Y.; Morita, H.; Kurihara, H.; Sugiyama, T.; Kato, N.; Ebihara, A.; Hamada, C.; Kurihara, Y.; Shindo, T.; Oh-hashii, Y.; Yazaki, Y. Evidence for association between paraoxonase gene polymorphisms and atherosclerotic diseases. *Atherosclerosis* 149:435–442; 2000.
- 110; Watzinger, N.; Schmidt, H.; Schumacher, M.; Schmidt, R.; Eber, B.; Fruhwald, F. M.; Zweiker, R.; Kostner, G. M.; Klein, W. Human paraoxonase 1 gene polymorphisms and the risk of coronary heart disease: a community based study. *Cardiology* 98:116– 122; 2002.
- 111; Ito, T.; Yasue, H.; Yoshimura, M.; Nakamura, S.; Nakayama, Y.; Shimasaki, Y.; Harada, E.; Mizuno, Y.; Kawano, H.; Ogawa, H. Paraoxonase gene Gln192Arg (Q192R) polymorphism is associated with coronary artery spasm. *Hum. Genet.* 110:89–94;2002.
- 112; Wang, X.; Fan, Z.; Huang, J.; Su, S.; Yu, Q.; Zhao, J.; Hui, R.; Yao, Z.; Shen, Y.; Qiang, B.; Gu, D. Extensive association analysis between polymorphisms of PON gene cluster with coronary heart disease in Chinese Han population. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23:328– 334; 2003.
- 113; Fortunate, G.; Rubba, P.; Panico, S.; Tronto, D.; Tinto, N.; Mazzaccara, C.; De Michele, M.; Iannuzzi, A.; Vitale, D. F.; Salvatore, F.; Sacchetti, L. A paraoxonase gene polymorphism, PON1 (55), as an independent risk factor for increased carotid intima-media thickness in middle-aged women. *Atherosclerosis* 167:141– 148; 2003.
- 114; Shih, D. M.; Gu, L.; Xia, Y. R.; Navab, M.; Li, W. F.; Hama, S.; Catelliani, L. W.; Furlong, C. E.; Costa, L. G.; Fogelman, A. M.; Lusis, A. J. Mice lacking serum paraoxonase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis. *Nature* 394: 284–287; 1998.
- 115; Shih, D. M.; Xia, Y. R.; Miller, E.; Castellani, L. W.; Subbanagounder, G.; Cheroutre, H.; Faull, K. F.; Berliner, J. A.; Witztum, J. L.; Lusis, A. J. Combined serum paraoxonase knockout/apolipoprotein E knockout mice exhibit increased lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *J. Biol. Chem.* 275: 17527– 17535; 2000.

116; Tward, A.; Xia, Y. R.; Wang, X. P.; Shi, Y. S.; Park, C.; Castellani, L. W.; Lusis, A. J.; Shih, D. M. Decreased atherosclerotic lesion formation in human serum paraoxonase transgenic mice. *Circulation* 106:484– 490; 2002.

117; Leus, F. R.; Zwart, M.; Kastelein, J. J.; Voorbij, H. A. PON2 gene variants are associated with clinical manifestations of cardiovascular disease in familial hypercholesterolemia patients. *Atherosclerosis* 154:641– 649; 2001.

118; Robert K, Chasse JF, Santiard-Baron D, et al. Altered gene expression in liver from a murine model of hyperhomocysteinemia. *J Biol Chem* 2003; 278:31504–31511.

119; Sozmen, E. Y., Mackness, B., Sozmen, B. et al. (2002) Effect of organophosphate intoxication on human serum paraoxonase. *Hum. Exp. Toxicol.* 21, 247–252

120; Serhatlioglu, S., Gursu, M. F., Gulcu, F., Canatan, H. And Godekmerdan, A. (2003) Levels of paraoxonase and arylesterase activities and malondialdehyde in workers exposed to ionizing radiation. *Cell Biochem. Funct.* 21, 371–375

121; Hotopf, M., Mackness, M. I., Nikolaou, V. et al. (2003) Paraoxonase in Persian GulfWar veterans. *J. Occup. Environ. Med.* 45, 668–675

122; Gonzalvo MC, Gil F, Hernandez AF, Villanueva E, Pla A. Inhibition of paraoxonase activity in human liver microsomes by exposure to EDTA, metals and mercurials. *Chem Biol Interact* 1997;105:169–79.

123; Debord J, Bollinger JC, Merle L, Dantoine T. Inhibition of human serum arylesterase by metal chlorides. *J Inorg Biochem* 2003;94:1–4.

124; Thai SF, Allen JW, De Angelo AB, George MM, Fuscoe JC. Altered gene expression in mouse livers after dichloroacetic acid exposure. *Mutat Res* 2003;543:167–80.

125; Ferre` N, Camps J, Cabre` M, Paul A, Joven J. Hepatic paraoxonase activity alterations and free radical production in rats with experimental cirrhosis. *Metabolism* 2001;50:997–1000.

- 126; Aviram M, Rosenblat M, Bisgaier CL, Newton RS. Atorvastatin and gemfibrozil metabolites, but not the parent drugs, are potent antioxidants against lipoprotein oxidation. *Atherosclerosis* 1998;138:271–80
- 127; Jarvik GP, Trevanian Tsai N, McKinstry LA, Wani R, Brophy VH, Richter RJ, et al. Vitamins C and E intake is associated with increased paraoxonase activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:1329–33.
- 128; Balogh Z, Seres I, Marangi M, Kovacs P, Kakuk G, Paragh G. Gemfibrozil increases paraoxonase activity in type 2 diabetic patients. A new hypothesis of the beneficial action of fibrates? *Diabetes Metab* 2001;27:604–10.
- 129; Paragh G, Seres I, Harangi M, Balogh Z, Illyes L, Boda J, et al. The effects of micronized fenofibrate on paraoxonase activity in patients with coronary heart disease. *Diabetes Metab* 2003;29:613–8.
- 130; Radic Z, Reiner E. Effect of atropine on esterases from human blood and pig liver. *Acta Pharm Jugosl* 1986;36:1–7.
- 131; Blatter-Garin MC, Kalix B, De Pre S, James RW. Aspirin use is associated with higher serum concentrations of the antioxidant enzyme, paraoxonase-1. *Diabetologia* 2003;46:593–4.
- 132; Ali B, Zhang Q, Lim YK, Feng D, Retnam L, Lim SK. Expression of major HDL-associated antioxidant PON1 is gender dependent and regulated during inflammation. *Free Radic Biol Med* 2003;34:824–9.
- 133; Van der Gaag, M. S., van Tol, A., Scheek, L. M. et al. (1999) Daily moderate alcohol consumption increases serum paraoxonase activity; a diet-controlled, randomised intervention study in middle-aged men. *Atherosclerosis* 147, 405–410
- 134; Sierksma, A., van der Gaag, M. S., van Tol, A., James, R. W. and Hendriks, H. F. (2002) Kinetics of HDL cholesterol and paraoxonase activity in moderate alcohol consumers. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 26, 1430–1435

- 135; Nishio, E. and Watanabe, Y. (1997) Cigarette smoke extract inhibits plasma paraoxonase activity by modification of the enzyme's free thiols. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 236, 289–293
- 136; James, R. W., Leviev, I. and Righetti, A. (2000) Smoking is associated with reduced serum paraoxonase activity and concentration in coronary artery disease patients. *Circulation* 101, 2252–2257
- 137; Ferre` N, Camps J, Fernandez-Ballart J, Arijia V, Murphy MM, Ceruelo S, et al. Regulation of serum paraoxonase activity by genetic, nutritional and lifestyle factors in the general population. *Clin Chem* 2003;49:1491–7.
- 138; Senti, M., Tomas, M., Anglada, R. et al. (2003) Interrelationship of smoking, paraoxonase activity, and leisure time physical activity: a population based study. *Eur. J. Intern. Med.* 14, 178–184
- 139; Wang, X., Huang, J., Fan, Z. et al. (2004) Genetic and environmental factors associated with plasma paraoxonase activity in healthy Chinese. *Int. J. Mol. Med.* 13, 445–450
- 140; Boemi, M., Sirolla, C., Testa, R., Cenerelli, S., Fumelli, P. and James, R. W. (2004) Smoking is associated with reduced serum levels of the antioxidant enzyme, paraoxonase, in Type 2 diabetic patients. *Diabet. Med.* 21, 423–427
- 141; Forte, T. M., Subbanagounder, G., Berliner, J. A. et al. (2002) Altered activities of anti-atherogenic enzymes LCAT, paraoxonase, and platelet-activating factor acetylhydrolase in atherosclerosis-susceptible mice. *J. Lipid Res.* 43, 477–485
- 142; Hedrick, C. C., Kholood, H., Hough, G. P. et al. (2000) Short term feeding of atherogenic diet to mice results in reduction of HDL and paraoxonase that may be mediated by an immune response. *Arterioscler., Thromb., Vasc. Biol.* 20, 1946–1952
- 143; Shih, D. M., Gu, L., Hama, S. et al. (1996) Genetic-dietary regulation of serum paraoxonase expression and its role in atherogenesis in a mouse model. *J. Clin. Invest.* 97, 1630–1639

- 144; Wallace, A. J., Sutherland, W. H., Mann, J. I. And Williams, S. M. (2001) The effect of meals rich in thermally stressed olive and safflower oils on postprandial serum paraoxonase activity in patients with diabetes. *Eur. J. Clin. Nutr.* 55, 951–958
- 145; Tomas, M., Senti, M., Eluosa, R. et al. (2001) Interaction between the Gln-Arg 192 variants of the paraoxonase gene and oleic acid intake as a determinant of highdensity lipoprotein cholesterol and paraoxonase activity. *Eur. J. Pharmacol.* 432, 121–128
- 146; Aviram, M., Rosenblat, M., Billecke, S. et al. (1999) Human serum paraoxonase (PON1) is inactivated by oxidised low density lipoprotein and preserved by antioxidants. *Free Radicals Biol. Med.* 26, 892–904
- 147; Kaplan, M., Hayek, T., Raz, A. et al. (2001) Pomegranate juice supplementation to atherosclerotic mice reduces macrophage lipid peroxidation, cellular cholesterol accumulation and development of atherosclerosis. *J. Nutr.* 131, 2082–2089
- 148; Hayek, T., Fuhrman, B., Vaya, J. et al. (1997) Reduced progression of atherosclerosis in the apolipoprotein E deficient mice following consumption of red wine, or its polyphenols quercetin, or catechin, is associated with reduced susceptibility of LDL to oxidation and to aggregation. *Arterioscler., Thromb., Vasc. Biol.* 17, 2744–2752
- 149; Gou'edard, C., Barouki, R. and Morel, Y. (2004) Dietary polyphenols increase paraoxonase 1 gene expression by an aryl hydrocarbon receptor-dependant mechanism. *Mol. Cell. Biol.* 24, 5209–5222
- 150; Beltowski J, Wojcicka G, Jamroz A. Leptin decreases plasma paraoxonase 1 (PON1) activity and induces oxidative stress: the possible novel mechanism for proatherogenic effect of chronic hyperleptinemia. *Atherosclerosis* 2003; 170:21–29.
- 151; Mueller RF, Hornung S, Furlong CE, Anderson J, Giblett ER, Motulsky AG. Plasma paraoxonase polymorphism: a new enzyme assay, population, family, biochemical and linkage studies. *Am J Hum Genet* 1983;35:393–408.

- 152; Moser VC, Chanda SM, Mortensen SR, Padilla S. Age -and genderrelated differences in sensitivity to chlorpyrifos in the rat reflect developmental profiles of esterase activities. *Toxicol Sci* 1998; 46:211–22.
- 153; Cole TB, Jampsa RL, Walter BJ, Arndt TL, Richter RJ, Shih DM, et al. Expression of human paraoxonase (PON1) during development. *Pharmacogenetics* 2003;13:1–8.
- 154; Augustinsson KB, Barr M. Age variation in plasma arylesterase activity in children. *Clin Chim Acta* 1963;8:568–73.
- 155; Ecobichon DJ, Stephens DS. Perinatal development of human blood esterases. *Clin Pharmacol Ther* 1973;14:41–7.
- 156; Karanth S, Pope C. Carboxylesterase and A-esterase activity during maturation and aging: relationship to toxicity of chlorpyrifos and parathion in rats. *Toxicol Sci* 2000;58:282–9.
- 157; Miloshevitich C, Khalil A. Study of the paraoxonase and plateletactivating factor acetylhydrolase activities with aging. *Prostagl Leukot Essent Fatty Acids* 2001;65:241–6.
- 158; Seres I, Paragh G, Deschene E, Fulop T, Khalil A. Study of factors influencing the decreased HDL associated PON1 activity with aging. *Exp Gerontol* 2004;39:59–66.
- 159; Xia, Y., Gueguen, R., Vincent-Viry, M., Siest, G. And Visvikis, S. (2003) Effect of six candidate genes on early aging in a French population. *Aging Clin. Exp. Res.* 15, 111–116
- 160; Senti, M., Tomas, M., Vila, J., Marrugat, J., Elosua, R. J. S. and Masia, R. (2001) Relationship of age-related myocardial infarction risk and Gln/Arg 192 variants of the human paraoxonase1 gene: the REGICOR study. *Atherosclerosis* 156, 443–449
- 161; Bonafe, M., Marchegiani, F., Cardelli, M. et al. (2002) Genetic analysis of paraoxonase (PON1) locus reveals an increased frequency of Arg192 allele in centenarians. *Eur. J. Hum. Genet.* 10, 292–296

162; Wehner JM, Murphy-Erdosh C, Smolen A, Smolen TS. Genetic variation in paraoxonase activity and sensitivity to disopropylphosphofluoridate in inbred mice. *Pharmacol Biochem Behav* 1987;28:317–20.

163; WeitmanSD,VodicnikMJ,Lech JJ. Influence of pregnancy on parathion toxicity and distribution. *Toxicol Appl Pharmacol* 1983;71:215–24.

164; Kordonouri, O., James, R. W., Bennetts, B. et al. (2001) Modulation by blood glucose levels of activity and concentration of paraoxonase in young patients with type 1 diabetes mellitus. *Metab. Clin. Exp.* 50, 657–660

165; Mackness, B., Mackness, M. I., Arrol, S. et al. (1998) Serum paraoxonase (PON1) 55 and 192 polymorphism and paraoxonase activity and concentration in non-insulin dependent diabetes mellitus. *Atherosclerosis* 139, 341–349

166; Mackness, B., Durrington, P. N., Boulton, A. J., Hine, D. and Mackness, M. I. (2002) Serum paraoxonase activity in patients with type 1 diabetes compared to healthy controls. *Eur. J. Clin. Invest.* 32, 259–256

167; Agachan, B., Yilmaz, H., Karaali, Z. and Isbir, T. (2004) Paraoxonase 55 and 192 polymorphism and its relationship to serum paraoxonase activity and serum lipids in Turkish patients with non-insulin dependent diabetes mellitus. *Cell. Biochem. Funct.* 22, 163–168

168; Kopprasch, S., Pietzsch, J., Kuhlisch, E. and Graessler, J. (2003) Lack of association between serum paraoxonase 1 activities and increased oxidized low-density lipoprotein levels in impaired glucose tolerance and newly diagnosed diabetes mellitus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88, 1711–1716

169; Sozmen, B., Delen, Y. F. K. G. and Sozmen, E. Y. (1999) Catalase and paraoxonase in hypertensive type 2 diabetes mellitus: correlation with glycemic control. *Clin. Biochem.* 32, 423–427

170; Mackness, B., Durrington, P. N., Abuashia, B., Boulton, A. J. and Mackness, M. I. (2000) Low paraoxonase activity in type II diabetes mellitus complicated by retinopathy. *Clin. Sci.* 98, 355–363

- 171; Kao, Y. L., Donaghue, K., Chan, A., Knight, J. And Silink, M. (1998) A variant of paraoxonase (PON1) gene is associated with diabetic retinopathy in IDDM. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83, 2589–2592
- 172; Pfohl, M., Koch, M., Enderle, M. D. et al. (1999) Paraoxonase 192 Gln/Arg gene polymorphism, coronary artery disease, and myocardial infarction in type 2 diabetes. *Diabetes* 48, 623–627
- 173; Aubo, C., Senti, M., Marrugat, J. et al. (2000) Risk of myocardial infarction associated with Gln/Arg 192 polymorphism in the human paraoxonase gene and diabetes mellitus. The REGICOR Investigators. *Eur. Heart J.* 21, 33–38
- 174; Deakin, S., Leviev, I., Nicaud, V., Brulhart Meynet, M. C., Tiret, L. and James, R. W. (2002) Paraoxonase-1 L55M polymorphism is associated with an abnormal oral glucose tolerance test and differentiates high risk coronary disease families. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87, 1268–1273
- 175; Chiu, K. C., Chuang, L. M., Chu, A., Lu, J., Hu, J. and Fernando, S. (2004) Association of paraoxonase 1 polymorphism with β -cell function: a case of molecular heterosis. *Pancreas* 28, e96–e103
- 176; Barbieri, M., Bonafe, M., Marfella, R. et al. (2002) LL-paraoxonase genotype is associated with a more severe degree of homeostasis model assessment IR in healthy subjects. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87, 222–225
- 177; Hedrick, C. C., Thorpe, S. R., Fu, M. X. et al. (2000) Glycation impairs high-density lipoprotein function. *Diabetologia* 43, 312–320
- 178; Ferretti, G., Bacchetti, T., Marchionni, C., Caldarelli, L. and Curatola, G. (2001) Effect of glycation of high density lipoproteins on their physiochemical properties and on paraoxonase activity. *Acta Diabetol.* 38, 163–169
- 179; Senti, M., Tomas, M., Fito, M. et al. (2003) Antioxidant paraoxonase 1 activity in the metabolic syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88, 5422–5426
- 180; Dantoine, T. F., Debord, J., Merle, L., Lacroix-Ramiandrisoa, H., Bourzeix, L. and Charmes, J. P. (2002) Paraoxonase 1 activity: a new vascular marker for dementia? *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 977, 96–101

- 181; Paragh, G., Balla, P., Katona, E., Seres, I., Egerhazi, A. And Degrell, I. (2002) Serum paraoxonase activity changes in patients with Alzheimer's disease and vascular dementia. *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 252, 63–67
- 182; Helbecque, N., Cottel, D., Codron, V., Berr, C. And Amouyel, P. (2004) Paraoxonase 1 gene polymorphisms and dementia in humans. *Neurosci. Lett.* 358, 41–44
- 183; Scacchi, R., Gambina, G., Martini, M. C., Broggio, E., Vilardo, T. and Corbo, R. M. (2003) Different pattern of association of paraoxonase Gln192→Arg polymorphism with sporadic late-onset Alzheimer's disease and coronary artery disease. *Neurosci. Lett.* 339, 17–20
- 184; Steinberg D, Clinical trials of antioxidants in atherosclerosis: are we doing the right thing? *Lancet* (1995) 346:36 38
- 185; Clarimon J, Eerola J, Hellstrom O, Tienari PJ, Singleton A, Paraoxonase 1 (PON1) gene polymorphisms and Parkinson's disease in a Finnish population.. *Neurosci Lett.* 2004 Sep 2;367(2):168-70
- 186; Delgado Alves J, Ames PR, Donohue S, Stanyer L, Nourooz-Zadeh J, Ravirajan C, Isenberg DA, Noorouz-Zadeh J. Antibodies to highdensity lipoprotein and beta2-glycoprotein I are inversely correlated with paraoxonase activity in systemic lupus erythematosus and primary antiphospholipid syndrome, *Arthritis Rheum.* 2003 Jan;48(1):284
- 187; Dantoine, T. F., Debord, J., Charmes, J. P. et al. (1998) Decrease of serum paraoxonase activity in chronic renal failure. *J. Am. Soc. Nephrol.* 9, 2082–2088
- 188; Hasselwander, O., McMaster, D., Fogarty, D. G., Maxwell, A. P., Nichols, D. P. and Young, I. S. (1998) Serum paraoxonase and platelet-activating factor acetylhydrolase in chronic renal failure. *Clin. Chem.* 44,179–182

- 189; Paragh, G., Seres, I., Balogh, Z. et al. (1998) The serum paraoxonase activity in patients with chronic renal failure and hyperlipidemia. *Nephron* 80, 166–170
- 190; Ferr'e, N., Camps, J., Prats, E. et al. (2002) Serum paraoxonase activity: a new additional test for the improved evalution of chronic liver damage. *Clin. Chem.* 48, 261–268
- 191; Mackness, B., Durrington, P. N. and Mackness, M. I. (2000) Low paraoxonase in Persian Gulf War veterans self reporting GulfWar Syndrome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 276, 729–733
- 192; Sklan, E. H., Lowenthal, A., Korner, M. et al. (2004) Acetylcholinesterase /paraoxonase genotype and expression predict anxiety scores in health, risk factors, excersise training and genetics study. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 5512–5517
- 193; Kumon Y, Nakauchi Y, Suehiro T, Shiinoki T, Tanimoto N, Inoue M, Nakamura T, Hashimoto K, Sipe JD (2002) Proinflammatory cytokines but not acute phase serum amyloid A or C-reactive protein, downregulate paraoxonase 1 (PON1) expression by HepG2 cells. *Amyloid* 9:160–164
- 194; Eckerson, H.W, Romson, J, Wyte, C.M, La Du, B.N. (1983) Human serum paraoxonase polymorphism: identification of phenotypes by their responses to salts. *Am J Hum Genet.* 35, 214-27.
- 195; Smolen, A, Eckerson, H.W, Gan, K.N, Hailat, N, La Du, B.N. (1991) Characteristics of the genetically determined allozymic forms of human serum paraoxonase/arylesterase. *Drug Metab Dispos.* 19, 107-112.
- 196; Krisch, K. (1968) Enzymatische hydrolyse von diathyl-p-nitro-phenylphosphat (E600) durch menschliches serum. *Z Klin Chem Klin Biochem.* 1, 41-45.
- 197; Zech, R, Zurcher, K. (1974) Organophosphate splitting serum enzymes in different mammals. *Comp Biochem Physiol.* 48,427-433.
- 198; Baskol G, Kose K. Paraoksonaz: biyokimyasal özellikleri, fonksiyonları ve klinik önemi. *Erciyes Tıp Fakültesi Dergisi* 2004; 26:75-80.

199; Charlton-Menys V, Liu Y, Durrington PN. Semiautomated method for determination of serum paraoxonase activity using paraoxon as substrate. Clin Chem 2006; 52-3; 453-7

200; Playfer J. R., Eze L. C., Bullen M. F. and Evans D. A. P. (1976) Genetic polymorphism and interethnic variability of plasma paraoxonase activity. J. Med. Genet. 13, 337–342.

